А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Albert L. Lehninger

PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY

The Johns Hopkins University
School of Medicine

Worth Publishers, Inc.

А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

В ТРЕХ ТОМАХ

3

Перевод с английского
канд. биол. наук В. Г. Горбулева,
канд. биол. наук М. Д. Гроздовой
и
канд. мед. наук С. Н. Преображенского

под редакцией
акад. В. А. Энгельгардта
и
проф. Я. М. Варшавского



МОСКВА «МИР» 1985

УДК 577.1
Л44
ББК 28.072

Ленинджер А.

Л44 Основы биохимии: В 3-х т. Т. 3. Пер. с англ.– М.: Мир, 1985.– 320 с., ил.

В издательстве «Мир» вышли два первых тома фундаментального руководства известного биохимика из США А. Ленинджера «Основы биохимии».

Первый том посвящен молекулам, образующим химическую основу живой природы (аминокислоты, белки, витамины, углеводы, липиды, микроэлементы, вода). Во второй том вошли материалы по биоэнергетике и метаболизму клетки.

Третий том посвящен биохимии человека и включает данные по пищеварению и всасыванию, интеграции обмена веществ, гормонам и питанию человека; рассмотрены вопросы, связанные с передачей генетической информации, структурой хромосом и генов, синтезом белка и его регуляцией, процессами репарации ДНК, мутациями, рекомбинацией и клонированием генов.

Предназначена для биологов разных специальностей, медиков, студентов и всех лиц, интересующихся молекулярными основами процессов жизнедеятельности.

Л $\frac{2001040000-498}{041/01/-85}$ св. пл. подписных изданий 1985 г.

**ББК 28.072
57.04**

Редакция биологической литературы

ЧАСТЬ III

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОХИМИИ ЧЕЛОВЕКА

Как мы могли уже убедиться в предыдущих главах, существует определенная непрерывность различных форм живого, которая проявляется в общности структуры клеток и их молекулярного состава, а также биоэнергетики и большинства путей клеточного метаболизма. Именно благодаря этой непрерывности биохимики могут изучать фундаментальные процессы, свойственные всем формам живого, на отдельных живых организмах, выбранных из-за их доступности, удобства использования или каких-то специфических биологических особенностей. Например, клетки дрожжей и экстракты мышц позволили нам узнать многое о гликолизе, а на клетках *E. coli* были раскрыты основные принципы молекулярной генетики. Более того, много важных данных, касающихся механизмов регуляции биохимических процессов, было получено при изучении таких необычных организмов, как плесневый гриб *Dictyostelium discoideum* и южноафриканская шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*. Поистине, в том, что касается фундаментальных биохимических процессов, разница между королями и капустой совсем невелика.

Перейдем теперь к рассмотрению одной специфической формы живого для того, чтобы определить, каковы биохимические механизмы адаптации этой формы, связанные с особенностями ее жизнедеятельности и занимаемой в биосфере ниши. Мы могли бы выбрать в качестве такой формы бактерию, тем более что в настоящее время становится все очевиднее, что бактерии являются значительно более сложными организмами, чем казалось раньше. Можно было бы рассмотреть также особенности биохимии растений, что представляло бы особый интерес в силу все возрастающего несоответствия между производительностью сельского хозяйства и мировыми потребностями в продуктах питания. Но больше всего нас, конечно, интересует биохимия *Homo sapiens*, особенности биохимического состава и функции его тканей и органов, способы координации их метаболической активности, а также то, как сказываются на здоровье людей различные биохимические нарушения.

В следующих трех главах мы остановимся на некоторых основных биохимических характеристиках организма человека, которые в то же время свойственны и многим другим высокоорганизованным животным. В частности, мы рассмотрим такие вопросы, как координация обмена веществ в различных тканях и органах, гормональная регуляция ответных реакций организма человека на изменения внешней и внутренней среды и правильное питание человека; разработка этой последней проблемы составляет одно из самых важных для человека достижений биохимии. Эти три главы представляют собой не более чем введение в биохимию человека, ибо сам предмет намного шире, сложнее и глубже и потому не может быть полностью раскрыт в данной книге. Кроме того, исследования по биохимии человека еще далеки от достижения своей конечной цели – мы знаем лишь очень малую часть того, что нам необходимо знать. Познание человеческой природы с биохимической точки зрения может быть достигнуто только

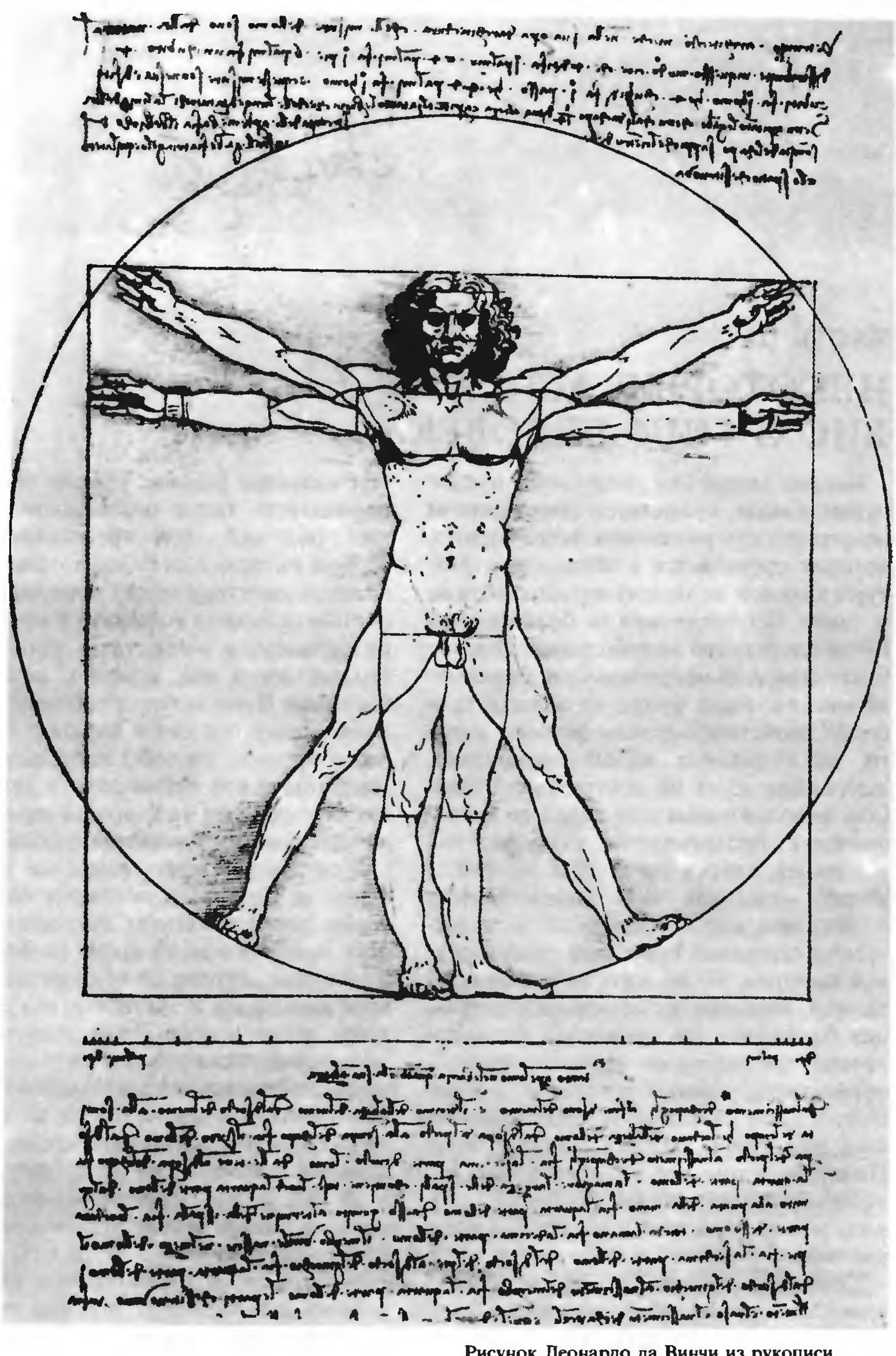


Рисунок Леонардо да Винчи из рукописи «Пропорции человека». Тело взрослого человека состоит приблизительно из 10^{13} клеток, каждая из которых содержит набор биомолекул, присутствующих в определенной пропорции, и имеет специфическую ультраструктуру. Из клеток организуются ткани, из тканей – органы, а из органов – системы органов; биохимическая активность каждой из систем великолепно координируется в рамках целостного организма, который не просто существует и двигается, но мыслит и творит.

после того, как нам станут понятны те высшие функции человеческого мозга, которые отличают *Homo sapiens* от всех других видов; для этого нужно ответить на вопросы о том, как хранится память, как преобразуются сенсорные импульсы в клетках мозга, как развивается логическое мышление и как, наконец, возникают и осуществляются поведение, мышление, творческие способности человека.

ГЛАВА 24

ПИЩЕВАРЕНИЕ, ТРАНСПОРТ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ И ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ

Эта глава – первая из трех, освещающих биохимические аспекты метаболизма и его регуляции у человека. Мы начнем с анализа биохимии пищеварения и всасывания продуктов питания в пищеварительном тракте, распределения питательных веществ между различными органами и взаимосвязей обмена веществ в разных тканях. Далее мы перейдем к биохимическим механизмам, посредством которых доставляется в ткани кислород, а также выводятся двуокись углерода и другие конечные продукты метаболизма.

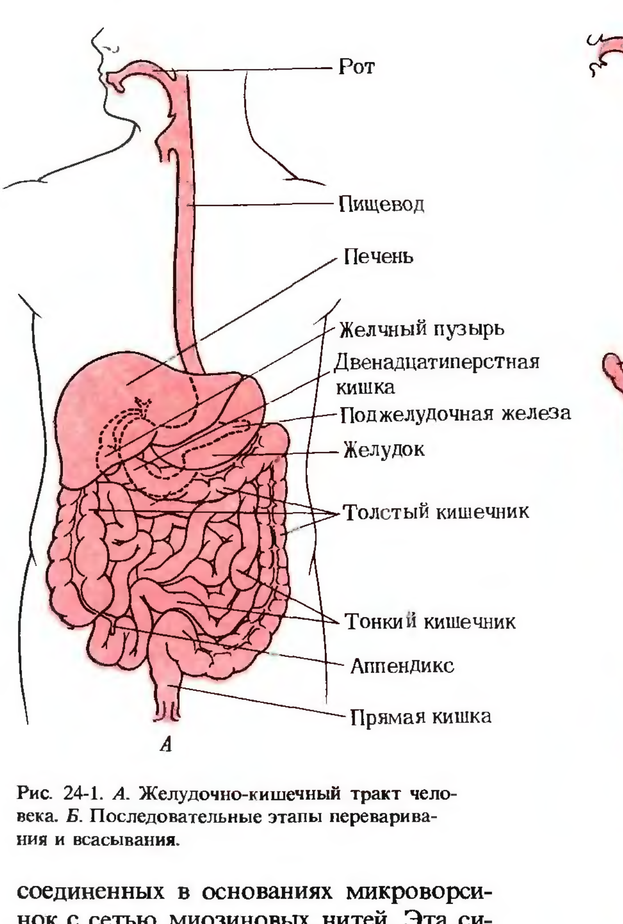
Одним из наиболее важных практических применений биохимии является диагностика заболеваний, сопровождающихся нарушением обмена веществ. На примере такой болезни обмена веществ, как сахарный диабет, мы увидим, какую важную роль играют биохимические анализы в медицине.

24.1. Пища подвергается ферментативному перевариванию, что подготавливает ее к последующему всасыванию

В процессе пищеварения в желудочно-кишечном тракте млекопитающих три основных компонента пищи – углеводы, жиры и белки – подвергаются ферментативному гидролизу, распадаясь при этом на составляющие строительные блоки, из которых они образованы. Этот процесс необходим для утилизации пищевых продуктов, поскольку клетки, выстилающие кишечник, способны всасывать в кровоток только относительно небольшие молекулы. Например, усвоение полисахаридов и даже дисахаридов становится возможным только после их полного гидролиза пищеварительными ферментами до моносахаридов. Аналогичным образом белки и липиды также должны быть гидролизованы до блоков, из которых они построены.

На рис. 24-1 приведена схема пищеварительной системы человека. Процесс пищеварения начинается с ротовой полости и желудка, тогда как конечные этапы переваривания всех основных компонентов пищи и всасывание в кровь составляющих их структурных блоков происходят в тонком кишечнике. Анатомически тонкий кишечник хорошо приспособлен для выполнения этой функции, поскольку он обладает очень большой площадью поверхности, через которую происходит всасывание. Тонкий кишечник характеризуется не только большой длиной (4–4,5 м), но также наличием на его внутренней поверхности множества складок с большим количеством пальцевидных выступов, называемых ворсинками. Каждая ворсинка покрыта эпителиальными клетками, несущими многочисленные микроворсинки (рис. 24-2). Ворсинки создают огромную поверхность, через которую продукты переваривания быстро транспортируются в эпителиальные клетки, а из них – в капилляры кровеносной системы и в лимфатические сосуды, расположенные в стенке кишечника. Площадь поверхности тонкого кишечника человека составляет ~ 180 м^2, т. е. лишь немногим меньше игровой площадки теннисного корта.

В микроворсинках содержатся пучки актиновых микрофиламентов (разд. 7.19),



Рот
Крахмал переваривается под действием амилазы слюны

Пищевод

HCl желудочного сока

Желудок
Под действием пепсина перевариваются белки

Желчный пузырь
Накапливаются соли желчных кислот

Поджелудочная железа
Образование протеолитических ферментов, амилазы, липазы, а также HCO_3^-

Двенадцатиперстная кишка, pH 7 – 8
Здесь в результате совместного действия ферментов, поставляемых поджелудочной железой и эпителием тонкого кишечника, переваривание в основном заканчивается

Конец тонкого кишечника
Всасывание в кровь простых сахаров, аминокислот, электролитов и H_2O; всасываемые жиры поступают в лимфатические сосуды

Толстый кишечник
Дальнейшее удаление H_2O; место действия бактерий

Б

Рис. 24-1. *А*. Желудочно-кишечный тракт человека. *Б*. Последовательные этапы переваривания и всасывания.

соединенных в основаниях микроворсинок с сетью миозиновых нитей. Эта система нитей обеспечивает волнообразные колебания микроворсинок, благодаря которым происходит местное перемешивание и лучшее всасывание переваренных питательных веществ.

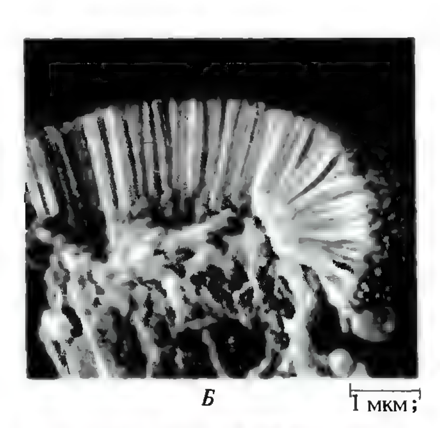
а. Переваривание углеводов

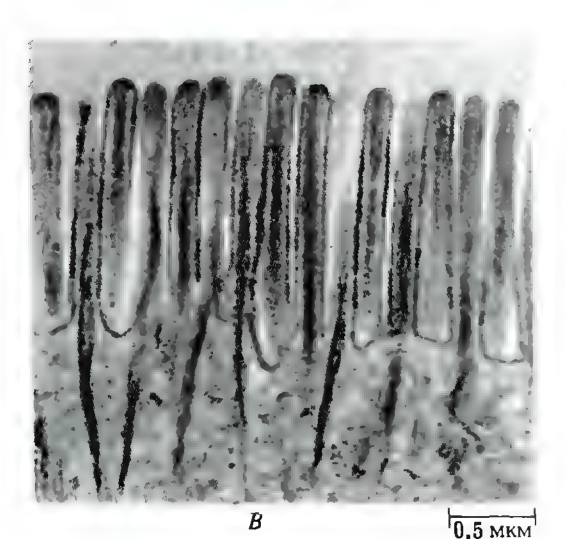
У человека из углеводов перевариваются в основном полисахариды – крахмал и целлюлоза, содержащиеся в растительной пище, и гликоген, содержащийся в пище животного происхождения. Крахмал и гликоген полностью расщепляются ферментами желудочно-кишечного тракта до составляющих их структурных блоков, а именно свободной D-глюкозы. Этот процесс начинается во рту во время пережевывания пищи благодаря действию фермента *амилазы*, выделяемого слюнными железами. Амилаза слюны гидролизует многие из $\alpha(1 \rightarrow 4)$-гликозидных связей в крахмале и в гликогене. При этом образуется смесь, состоящая из мальтозы, глюкозы и олигосахаридов. Когда мы жуем сухари или крекеры, они становятся постепенно слаще, поскольку содержащийся в них безвкусный крахмал подвергается ферментативному гидролизу с образованием сахаров. Переваривание крахмала, глико-

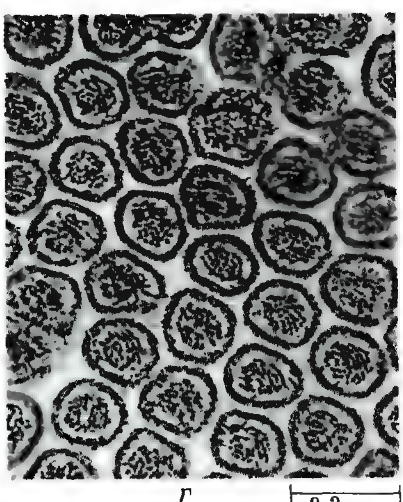
гена и других усвояемых полисахаридов с образованием D-глюкозы продолжается и завершается в тонком кишечнике главным образом под действием *амилазы поджелудочной железы*, которая синтезируется в поджелудочной железе и поступает через проток поджелудочной железы в верхний отдел тонкого кишечника. Этот отдел тонкого кишечника с наиболее высокой пищеварительной активностью называется *двенадцатиперстной кишкой*.

Целлюлоза у большинства млекопитающих не подвергается ферментативному гидролизу и не используется из-за отсутствия ферментов, способных расщеплять $\beta(1 \rightarrow 4)$-связи между последова-

Рис. 24-2. *А*. Ворсинки слизистой тонкого кишечника; видно, как велика площадь, через которую происходит всасывание продуктов пищеварения. Всасываемые аминокислоты, сахара и соли поступают в кровеносные капилляры, а триацилглицеролы – в расположенные в центре ворсинок лимфатические сосуды. Каждая эпителиальная клетка несет большое число микроворсинок. *Б*. Микрофотография ворсинок, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. *В*, *Г*. Микрофотографии соответственно продольного и поперечного срезов ворсинок, полученные с помощью трансмиссионного электронного микроскопа; видны внутренние микрофиламенты, обеспечивающие волнообразное движение ворсинок.







тельными остатками D-глюкозы в целлюлозе (разд. 11.8). Вместе с тем непереваренная целлюлоза из растительной пищи создает ту массу (называемую иногда «клетчаткой» или «грубым кормом»), которая способствует нормальной перистальтике кишечника. У жвачных животных целлюлоза подвергается перевариванию, но не прямым путем, а под действием бактерий, находящихся в их рубце (желудке). Эти бактерии гидролизуют целлюлозу до D-глюкозы и далее сбраживают D-глюкозу до лактата, ацетата и пропионата, которые всасываются и поступают в кровь. Далее лактат и пропионат в печени жвачных превращаются в сахар крови (разд. 20.10).

Гидролиз *дисахаридов* катализируют ферменты, находящиеся в наружном крае эпителиальных клеток, выстилающих тонкий кишечник. Сахароза, или тростниковый сахар, гидролизуется с образованием D-глюкозы и D-фруктозы под действием *сахаразы*, называемой также *инвертазой*; лактоза гидролизуется до D-глюкозы и D-галактозы под действием *лактазы*, называемой также *β-галактозидазой*; в результате гидролиза мальтозы под действием мальтазы образуются две молекулы D-глюкозы. Напомним (разд. 11.5), что многим представителям азиатских и африканских рас во взрослом состоянии свойственна *непереносимость лактозы*, обусловленная исчезновением в их тонком кишечнике лактазной активности, имевшейся в грудном и детском возрасте. У людей с непереносимостью лактозы этот сахар остается в кишечнике в нерасщепленном виде и часть его подвергается сбраживанию под действием микроорганизмов. Это вызывает диаррею и образование газов в кишечнике.

В эпителиальных клетках, выстилающих тонкий кишечник, D-фруктоза, D-галактоза и D-манноза частично превращаются в D-глюкозу (разд. 15.9). Смесь всех этих простых гексоз поглощается эпителиальными клетками, выстилающими тонкий кишечник, и доставляется кровью в печень.

б. Переваривание белков

Белки пищи расщепляются ферментами в желудочно-кишечном тракте до составляющих их аминокислот. Белки, поступающие в желудок, стимулируют выделение гормона *гастрина*, который в свою очередь вызывает секрецию соляной кислоты *обкладочными клетками* желез слизистой желудка (рис. 24-3), а также пепсиногена *главными клетками*. Желудочный сок имеет pH от 1,5 до 2,5. Благодаря такой кислотности он действует как антисептик, убивая большинство бактерий и других клеток. Кроме того, в условиях низкого pH желудочного сока глобулярные белки подвергаются денатурации, их молекулы разворачиваются и вследствие этого внутренние пептидные связи полипептидных цепей становятся более доступными для ферментативного гидролиза. *Пепсиноген* (мол. масса 40000), являющийся неактивным предшественником фермента, или зимогеном, превращается в желудоч-

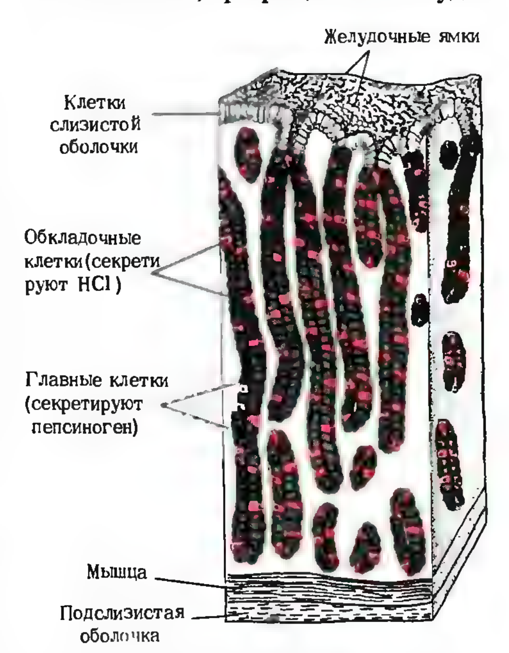


Рис. 24-3. Железы слизистой желудка. Обкладочные клетки секретируют HCl под действием гормона гастрина, который продуцируется эпителиальными клетками при поступлении в желудок белков. Главные клетки секретируют пепсиноген.

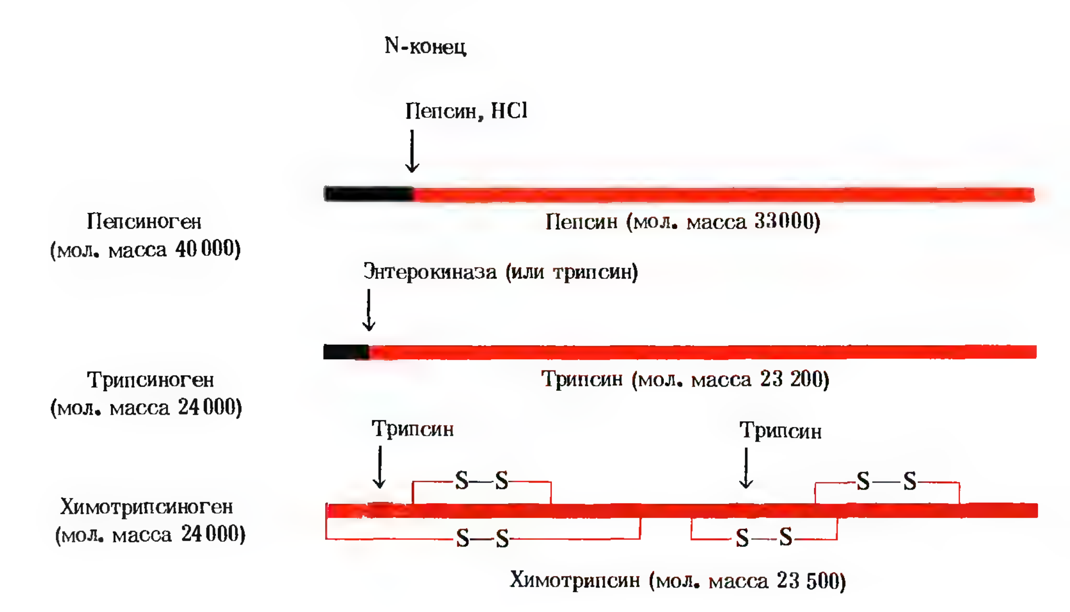


Рис. 24-4. Активация зимогенов пепсина, трипсина и химотрипсина. На диаграммах показаны участки зимогенов, подвергающиеся протеолизу, в результате которого высвобождаются активные ферменты (показаны красным). Те фрагменты полипептидных цепей зимогенов, которые отщепляются или вырезаются, показаны черным. Обратите внимание, что химотрипсин состоит из трех полипептидных цепей, ковалентно связанных друг с другом двумя дисульфидными связями и нековалентно – за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий (дополнение 9-4).

ном соке в активный пепсин в результате ферментативного действия самого пепсина, т. е. путем *автокатализа*. В ходе этого процесса (рис. 24-4) с N-конца полипептидной цепи пепсиногена отщепляются 42 аминокислотных остатка в виде смеси коротких пептидов. Остающаяся интактной остальная часть молекулы пепсиногена представляет собой ферментативно активный пепсин (мол. масса 33 000). В желудке пепсин гидролизует те пептидные связи в белках, которые образованы ароматическими аминокислотами – тирозином, фенилаланином и триптофаном, а также рядом других (табл. 24-1); в итоге из длинных полипептидных цепей образуется смесь более коротких пептидов.

Как только кислое содержимое желудка попадает в тонкий кишечник, в нем под влиянием низкого pH начинается секреция гормона *секретина*, поступающего в кровь. Этот гормон в свою очередь стимулирует выделение из поджелудочной железы в тонкий кишечник бикарбоната, что приводит к нейтрализации HCl желудочного сока. В результате pH резко возрастает от 1,5–2,5, до ~7. В тонком кишечнике переваривание белков продолжается. Поступление аминокислот в двенадцатиперстную кишку вызывает освобождение гормона *холецистокинина* (разд. 25.22), который стимулирует секре-

Таблица 24-1. Ферменты, участвующие в переваривании белков, и их специфичность в отношении пептидных связей, образуемых разными аминокислотными остатками

Пепсин	Tyr, Phe, Trp, а также Leu, Glu, Gln
Трипсин	Lys, Arg
Химотрипсин	Tyr, Phe, Trp
Карбоксипептидаза	Последовательное отщепление С-концевых остатков
Аминопептидаза	Последовательное отщепление N-концевых остатков (за исключением остатков пролина)

цию нескольких ферментов поджелудочной железы с оптимумом pH около 7. Три из них – *трипсин, химотрипсин* и *карбоксипептидаза* – вырабатываются экзокринными клетками поджелудочной железы (рис. 24-5) в виде ферментативно неактивных зимогенов – соответственно *трипсиногена, химотрипсиногена* и *прокарбоксипептидазы*. Благодаря синтезу протеолитических ферментов в виде неактивных предшественников экзокринные клетки не подвергаются разрушению этими ферментами. Попав в тонкий кишечник, трипсиноген превращается в активную форму – трипсин (рис. 24-4) – под действием энтерокиназы, специализированного протеолитического фермента, секретируемого клетками кишечного эпителия. Свободный трипсин по мере своего образования также участвует в каталитическом превращении трипсиногена в трипсин. Образование свободного трипсина обусловлено отщеплением гексапептида от N-конца полипептидной цепи трипсиногена. Как мы уже видели (разд. 6.7), трипсин гидролизует пептидные связи, образованные с участием карбонильных групп *лизина* и *аргинина* (табл. 24-1).

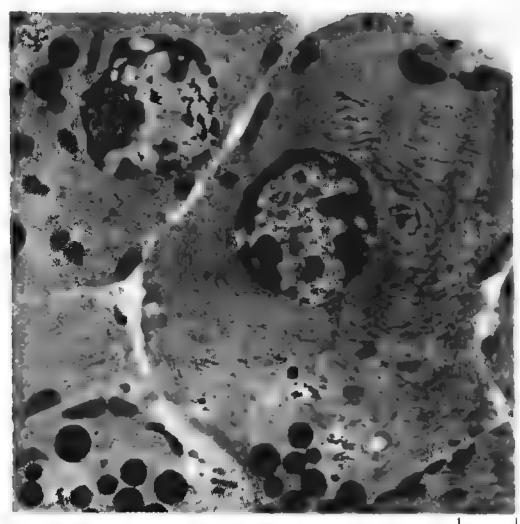


Рис. 24-5. Экзокринные клетки поджелудочной железы. Цитоплазма клеток целиком заполнена шероховатым эндоплазматическим ретикулумом. Находящиеся на его мембранах рибосомы синтезируют полипептидные цепи зимогенов многих пищеварительных ферментов. Зимогены накапливаются в вакуолях, превращающихся в конце концов в зрелые зимогенные гранулы. При стимуляции клетки ее плазматическая мембрана сливается с мембраной, окружающей зимогенные гранулы; последние видны в нижней части рисунка в виде темных частиц сферической формы. Содержимое гранул высвобождается в просвет протока (светлая область в нижней левой части рисунка) посредством экзоцитоза. Отдельные протоки в конечном итоге ведут в общий проток поджелудочной железы и далее в тонкую кишку.

Молекула *химотрипсиногена* представляет собой одну полипептидную цепь с несколькими внутрицепочечными дисульфидными связями. Попав в тонкий кишечник, химотрипсиноген превращается в химотрипсин под действием трипсина, который разрывает длинную полипептидную цепь химотрипсиногена в двух местах, выстригая дипептиды (рис. 24-4). Три фрагмента, образовавшиеся из исходной цепи химотрипсиногена, удерживаются, однако, вместе посредством перекрестных дисульфидных связей (дополнение 9-4). Химотрипсин гидролизует пептидные связи, образованные остатками *фенилаланина, тирозина* и *триптофана* (табл. 24-1). Следовательно, трипсин и химотрипсин расщепляют полипептиды, образовавшиеся в желудке под действием пепсина, на пептиды меньшей величины. Этот этап переваривания белков протекает с очень высокой эффективностью, поскольку пепсин, трипсин и химотрипсин проявляют при гидролизе полипептидных цепей разную специфичность в отношении пептидных связей, образованных разными аминокислотами.

Деградация коротких пептидов в тонком кишечнике осуществляется другими пептидазами. К ним относится в первую очередь *карбоксипептидаза* – цинксодержащий фермент (разд. 10.21), синтезируемый в поджелудочной железе в виде неактивного зимогена *прокарбоксипепти-*

дазы. Карбоксипептидаза последовательно отщепляет от пептидов С-концевые остатки. Тонкий кишечник секретирует также *аминопептидазу,* отщепляющую от коротких пептидов один за другим N-концевые остатки (табл. 24-1). В результате последовательного действия этих протеолитических ферментов и пептидаз перевариваемые белки в конечном итоге превращаются в смесь свободных аминокислот, которые далее транспортируются через эпителиальные клетки, выстилающие тонкие кишки. Свободные аминокислоты проникают в капилляры ворсинок и переносятся кровью в печень.

В желудочно-кишечном тракте человека не все белки перевариваются целиком (гл. 26). Большинство животных белков почти полностью гидролизуются до аминокислот, однако ряд фибриллярных белков, например кератин, переваривается только частично. Многие белки растительной пищи, в частности белки зерен злаков, неполностью расщепляются в силу того, что белковая часть семян и зерен покрыта неперевариваемой целлюлозной оболочкой (шелухой).

Известно редкое заболевание *стеаторрея* (упорный понос), при котором ферменты кишечника не способны переваривать определенные водорастворимые белки зерна, в частности *глиадин,* повреждающий эпителиальные клетки кишечника. Понятно, что из пищи таких больных следует исключить зерновые продукты. Другим заболеванием, связанным с отклонением от нормы активности протеолитических ферментов пищеварительного тракта, является *острый панкреатит.* При этом заболевании, обусловленном нарушением процесса выделения сока поджелудочной железы в кишечник, предшественники протеолитических ферментов (зимогены) превращаются в соответствующие каталитически активные формы слишком рано, будучи еще внутри клеток поджелудочной железы.

В результате эти мощные ферменты воздействуют на ткань самой железы, вызывая глубокое и очень болезненное разрушение органа, что может привести к смертельному исходу. В норме зимогены, выделяемые поджелудочной железой, не активируются до тех пор, пока не попадут в тонкий кишечник. Поджелудочная железа защищается от самопереваривания и другим путем: в ней синтезируется особый белок – специфический *ингибитор трипсина.* Поскольку свободный трипсин активирует не только трипсиноген и химотрипсиноген, но также и зимогены двух других пищеварительных ферментов – прокарбоксипептидазу и проэластазу,– ингибитор трипсина успешно предотвращает преждевременное образование свободных протеолитических ферментов в клетках поджелудочной железы.

в. Переваривание жиров

Переваривание триацилглицеролов (нейтральных жиров) начинается в тонком кишечнике, куда из поджелудочной железы поступает зимоген *пролипаза.* Здесь пролипаза превращается в активную липазу, которая в присутствии *желчных кислот* (см. ниже) и специального белка, называемого *колипазой,* присоединяется к капелькам триацилглицеролов и катализирует гидролитическое отщепление одного или обоих крайних жирнокислотных остатков с образованием смеси свободных жирных кислот в виде их Na^+- или K^+-солей (мыл) и 2-моноацилглицеролов (рис. 24-6). Небольшое количество триацилглицеролов остается при этом негидролизованным.

Образовавшиеся мыла и нерасщепленные ацилглицеролы эмульгируются в виде мелких капелек под действием *перистальтики* (перемешивающие движения кишечника), а также под влиянием солей желчных кислот и моноацилглицеролов, которые являются амфипатическими соединениями и потому функционируют как детергенты. Жирные кислоты и моноацилглицеролы из этих капелек поглощаются кишечными клетками, где из них в основном вновь синтезируются триацилглицеролы (разд. 21.8). Далее триацилглицеролы проникают не в капилляры крови, а в небольшие лимфатические сосуды кишечных ворсинок – лактеали (иначе – млечные, или хи-

лёзные, сосуды). Оттекающая от тонких кишок лимфа, называемая *хилус* (млечный сок), после переваривания жирной пищи напоминает по виду молоко из-за обилия взвешенных в ней *хиломикронов* – мельчайших капелек эмульгированных триацилглицеролов диаметром

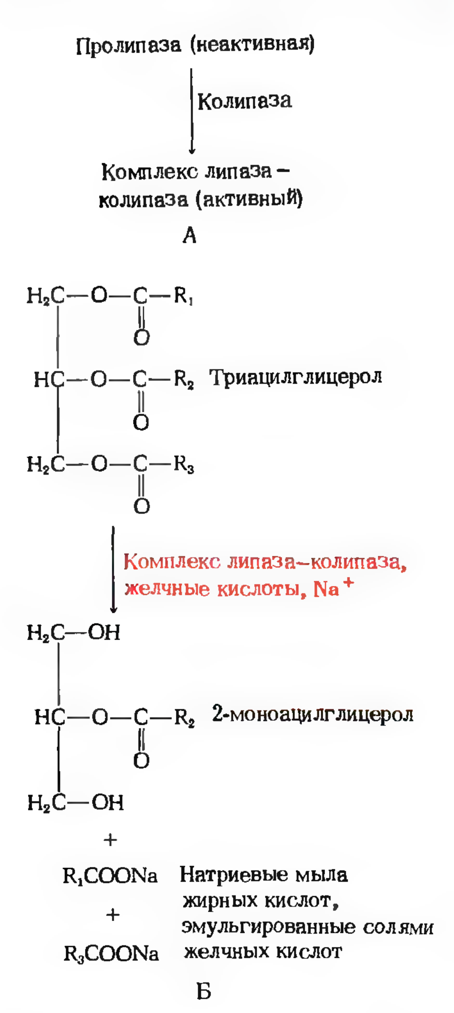


Рис. 24-6. *А*. Активация липазы. Пролипаза, секретируемая поджелудочной железой, активируется в тонком кишечнике. Колипаза – небольшой белок (мол. масса 10000), который присоединяется к липазе и стабилизирует фермент. *Б*. Действие липазы на триацилглицеролы. Липаза катализирует гидролиз триацилглицеролов с высвобождением 2-моноацилглицерола и 1- и 3-ацильных групп в виде омыленных жирных кислот. Протеканию этой реакции способствуют соли желчных кислот, эмульгирующие мыла жирных кислот.

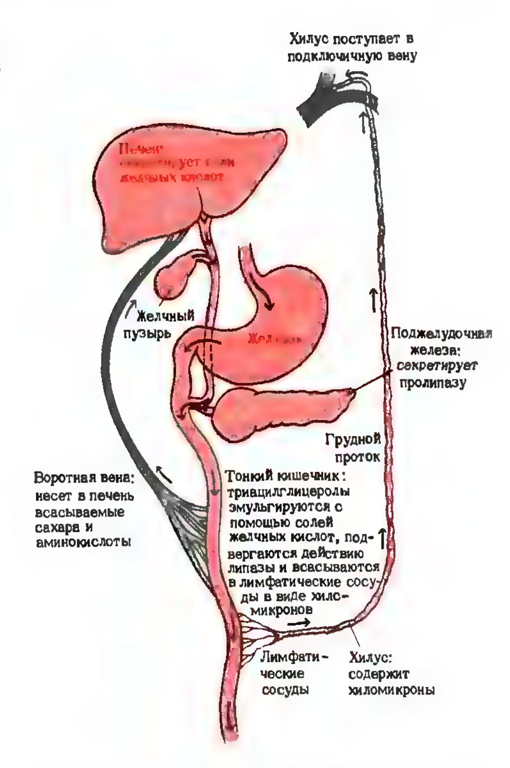


Рис. 24-7. Схематическое изображение основных этапов переваривания и всасывания жиров. Обратите внимание, что желчные кислоты движутся по кругу из печеии в тонкий кишечник, затем подвергаются обратному всасываиию, поступают в лимфатические сосуды и почечные веиы и возвращаются в печень. Часть желчных кислот обычно теряется в каждом цикле, попадая в кал.

около 1 мкм. Хиломикроны имеют гидрофильную оболочку, состоящую из фосфолипидов и специального белка, который удерживает хиломикроны во взвешенном состоянии. Хиломикроны проходят через грудной проток в подключичную вену (рис. 24-7). После потребления жирной пищи даже плазма крови становится опалесцирующей из-за высокой концентрации в ней хиломикронов, но эта опалесценция исчезает через 1–2 ч, так как триацилглицеролы выводятся из крови, поступая главным образом в жировую ткань.

Эмульгированию и перевариванию липидов в тонком кишечнике способствуют соли желчных кислот. Соли желчных кислот человека – это в основном *гликохолат натрия* и *таурохолат натрия*, обе

Рис. 24.8. Холевая кислота и ее конъюгированные формы – таурохолат и гликохолат. Благодаря своим амфипатическим свойствам гликохолат и таурохолат – отличные детергенты и эмульгаторы. Группы глицина и таурина (на красном фоне) гидрофильны, тогда как стероидное ядро – гидрофобно.

они являются производными *холевой кислоты* (рис. 24-8), которая количественно преобладает среди четырех основных желчных кислот, присутствующих в организме человека. Соли желчных кислот являются мощными эмульгаторами; они поступают из печени в желчь, которая изливается в верхний отдел тонкого кишечника. После завершения всасывания жирных кислот и моноацилглицеролов из эмульгированных капелек жира в нижнем отделе тонкого кишечника происходит обратное всасывание также и солей желчных кислот, способствовавших этому процессу. Они возвращаются в печень и используются повторно. Таким образом, желчные кислоты постоянно циркулируют между печенью и тонким кишечником (рис. 24-7).

Желчные кислоты играют исключительно важную роль в усвоении не только триацилглицеролов, но и вообще всех жирорастворимых компонентов пищи. Если желчные кислоты образуются или секретируются в недостаточном количестве, как это имеет место при ряде заболеваний, то непереваренные и непоглощенные жиры появляются в кале. При этом ухудшается всасывание жирорастворимых витаминов A, D, E и K (разд. 10.13) и может возникнуть пищевая недостаточность витамина A.

24.2. Печень осуществляет обработку и распределение питательных веществ

За исключением большей части триацилглицеролов, питательные вещества, поглощенные в кишечном тракте, поступают непосредственно в печень – основной центр распределения питательных веществ у позвоночных. Здесь сахара, аминокислоты и некоторые липиды подвергаются дальнейшим превращениям и распределяются между разными органами и тканями. Посмотрим, как же происходит интеграция путей метаболизма основных питательных веществ в печени.

24.3. В печени имеется пять путей метаболизма сахаров

Большая часть потребленной свободной D-глюкозы в печени фосфорилируется при помощи ATP с образованием глюкозо-6-фосфата. Поглощенные в тонком кишечнике D-фруктоза, D-галактоза и D-манноза также превращаются в D-глюкозо-6-фосфат в результате ферментативного процесса, рассмотренного ранее (разд. 15.9). D-глюкозо-6-фосфат лежит, таким образом, на перекрестке всех путей превращения углеводов в печени. Метаболизм этого соединения в печени может осуществляться по пяти основным направлениям, и выбор какого-нибудь одного из них зависит от ежечасно и даже ежеминутно меняющихся «спроса и предложения» (рис. 24-9).

а. Превращение в глюкозу крови

Глюкозо-6-фосфат может дефосфорилироваться под действием глюкозо-6-фосфатазы с образованием свободной D-глюкозы, которая поступает в кровоток и доставляется в другие ткани. Этот путь превращения глюкозо-6-фосфата

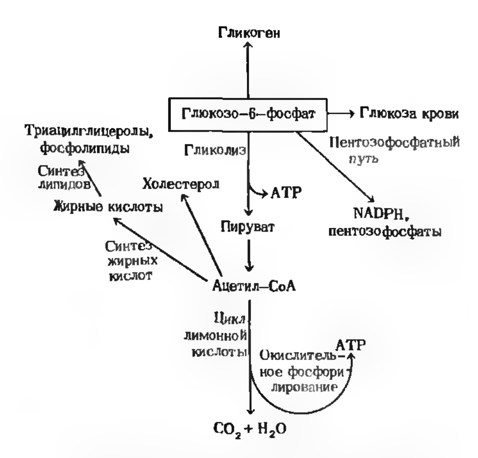


Рис. 24-9. Пути превращения глюкозо-6-фосфата в печени. Здесь, так же как и на рис. 24-10 и 24-11, пути биосинтеза показаны стрелками, направленными вверх, пути распада – стрелками, направленными вниз, а распределение по другим органам – горизонтальными стрелками.

имеет первостепенное значение, поскольку концентрация глюкозы в крови должна поддерживаться на достаточно высоком уровне, необходимом для обеспечения энергией мозга и других тканей.

б. Превращение в гликоген

То количество глюкозо-6-фосфата, которое не было использовано для немедленного превращения в глюкозу крови, превращается в гликоген в результате последовательного действия *фосфоглюкомутазы* и *гликоген-синтазы* (разд. 20.13).

в. Превращение в жирные килоты и холестерол

Избыток глюкозо-6-фосфата, не использованного для образования глюкозы крови или гликогена печени, распадается в ходе гликолиза и последующего действия пируватдегидрогеназы до ацетил-CoA, который превращается в малонил-CoA и далее в жирные кислоты (разд. 21.7). Жирные кислоты идут на образование триацилглицеролов и фосфолипидов (разд. 21.8), которые частично экспортируются в другие ткани, куда их переносят липопротеины плазмы. Определенная доля ацетил-CoA в печени идет на синтез холестерола (разд. 21.16).

г. Окислительный распад до CO_2

Ацетил-CoA, образующийся из глюкозо-6-фосфата в ходе гликолиза и последующего декарбоксилирования пирувата, может быть окислен в цикле лимонной кислоты. Последующий транспорт электронов и окислительное фосфорилирование приводят к накоплению энергии в виде ATP. Однако в норме для окисления в цикле лимонной кислоты в печени используются преимущественно жирные кислоты.

д. Распад по пентозофосфатному пути

Глюкозо-6-фосфат служит субстратом пентозофосфатного пути, в ходе которого образуются: 1) NADPH – восстановитель, необходимый для восстановительных этапов биосинтеза жирных кислот и холестерола (разд. 21.5), и 2) D-рибозо-5-фосфат – предшественник биосинтеза нуклеотидов (разд. 16.13).

Под действием различных регуляторных ферментов, а также гормонов (гл. 25) в печени происходит распределение потоков глюкозных остатков по перечисленным выше путям в зависимости от соотношения между потребностями организма и поступлением углеводов с пищей.

24.4. Для аминокислот также есть пять путей метаболизма

Аминокислоты, всосавшиеся в кишечнике и поступившие затем в печень, также имеют несколько основных путей метаболизма (рис. 24-10).

а. Транспорт в другие ткани

Аминокислоты из печени могут поступать в систему кровообращения и таким образом доставляться в другие органы, а там использоваться в качестве строительных блоков для биосинтеза тканевых белков (гл. 29).

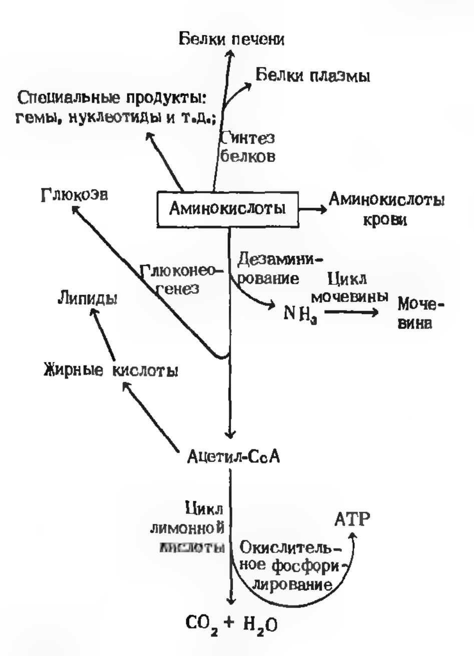


Рис. 24-10. Пути превращения аминокислот в печени.

б. Биосинтез белков печени и плазмы крови

Белки печени подвергаются постоянному обновлению, причем для них характерна очень высокая скорость оборота со средним периодом полужизни всего лишь в несколько дней. Кроме того, именно в печени синтезируется большинство *белков плазмы крови.*

в. Дезаминирование и распад

Те аминокислоты, которые не были использованы в печени или в других органах для биосинтеза белков, подвергаются дезаминированию и распадаются с образованием ацетил-СоА и промежуточных субстратов цикла лимонной кислоты (разд. 22.21). Последние могут превратиться в глюкозу и гликоген путем глюконеогенеза (разд. 20.1). Ацетил-СоА либо подвергается окислению в цикле лимонной кислоты с накоплением энергии, запасаемой в форме АТР, либо превращается в липиды, которые, как было описано выше, откладываются в запас. Высвобождающийся при распаде аминокислот аммиак превращается в продукт экскреции – *мочевину* в ходе протекающего в печени цикла мочевины (разд. 19.15).

г. Участие в цикле глюкоза – аланин

Печень участвует также в метаболизме аминокислот, поступающих время от времени из периферических тканей. Спустя несколько часов после каждого приема пищи из мышц в печень поступает аланин; в печени он подвергается дезаминированию, а образующийся пируват в результате глюконеогенеза превращается в глюкозу крови (разд. 19.12). Глюкоза возвращается в скелетные мышцы для восполнения в них запасов гликогена. Одна из функций этого циклического процесса, называемого циклом глюкоза – аланин, состоит в том, что он смягчает колебания уровня глюкозы в крови в период между приемами пищи. Сразу после переваривания и всасывания углеводов пищи, а также после превращения части гликогена печени в глюкозу в кровь поступает достаточное количество глюкозы. Но в период, предшествующий очередному приему пищи, происходит частичный распад мышечных белков до аминокислот, которые путем переаминирования передают свои аминогруппы на продукт гликолиза пируват с образованием аланина. Таким образом, в виде аланина в печень доставляется и пируват, и NH_3. В печени аланин подвергается дезаминированию, образующийся пируват превращается в глюкозу, поступающую в кровь, а NH_3 включается в состав мочевины и выводится из организма. Возникший в мышцах дефицит аминокислот в дальнейшем после еды восполняется за счет всасываемых аминокислот пищи.

д. Превращение в нуклеотиды и другие продукты

Аминокислоты служат предшественниками в биосинтезе пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеотидов (разд. 22.13), а также в синтезе некоторых специализированных веществ, в частности

порфиринов (разд. 22.10), гормонов и других азотсодержащих соединений. Эти пути превращений аминокислот суммированы на рис. 24-10.

24.5. Существует пять путей превращения липидов

Как показано на рис. 24-11, для жирных кислот, входящих в состав липидов, также характерно несколько путей метаболизма в печени.

а. Окисление до CO_2 с образованием ATP

Свободные жирные кислоты подвергаются активации и окислению с образованием ацетил-СоА и ATP (разд. 18.8). Далее ацетил-СоА окисляется в цикле лимонной кислоты, и в ходе окислительного фосфорилирования образуется ATP. Жирные кислоты служат основным субстратом энергетического обмена в печени.

б. Образование кетоновых тел

Избыток ацетил-СоА, высвобожденный при окислении жирных кислот и не использованный печенью, превращается в кетоновые тела – ацетоацетат и D-β-гидроксибутират, – которые переносятся кровью в периферические ткани, где используются для окисления в цикле лимонной кислоты (разд. 18.10). Кетоновые тела можно рассматривать как транспортную форму ацетильных групп. Их вклад в энергетику периферических тканей может быть очень значительным: в сердце, например, они удовлетворяют до одной трети энергетических потребностей.

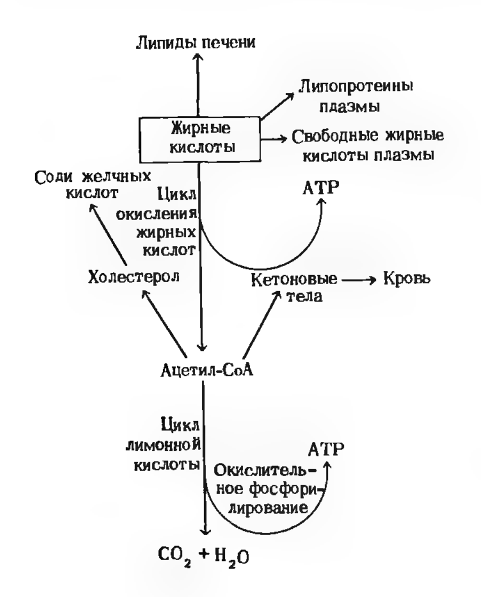


Рис. 24-11. Обмен жирных кислот в печени.

в. Биосинтез холестерола и желчных кислот

Часть ацетил-СоА, образованного из жирных кислот (и из глюкозы), служит основным предшественником в биосинтезе холестерола, который в свою очередь является предшественником желчных кислот, необходимых для переваривания и всасывания жиров (разд. 21.17 и 24.1,в).

г. Биосинтез липопротеинов плазмы крови

Жирные кислоты служат также предшественниками в синтезе липидной части липопротеинов плазмы крови. Липопротеины функционируют как переносчики липидов в жировую ткань, где последние накапливаются в виде триацилглицеролов.

д. Образование свободных жирных кислот плазмы крови

Свободные жирные кислоты связываются с сывороточным альбумином и далее доставляются кровью в сердце и скелетные мышцы; эти органы поглощают и используют жирные кислоты в качестве основного «топлива».

Таким образом, метаболизм печени обладает исключительной гибкостью и широким диапазоном. Печень хорошо приспособлена для выполнения функции «распределительного центра» в организме. Она обеспечивает доставку требуемых количеств питательных веществ в другие органы, сглаживает колебания

в обмене веществ, обусловленные неравномерностью поступления пищи, а также осуществляет превращение избытка аминогрупп в мочевину и другие продукты, которые выводятся почками.

Помимо превращения и распределения углеводов, жиров и аминокислот в печени активно протекают процессы ферментативной детоксикации инородных органических соединений, например лекарств, пищевых добавок, консервантов и других потенциально вредных веществ, не имеющих пищевой ценности. Детоксикация обычно состоит в том, что относительно нерастворимые соединения подвергаются ферментативному гидроксилированию, в результате чего они становятся более растворимыми, легче расщепляются и выводятся из организма.

24.6. Каждый орган обладает специализированными метаболическими функциями

Почти все клетки позвоночных снабжены необходимыми ферментами, катализирующими основные пути метаболизма, в частности те, которые обеспечивают выработку энергии в форме АТР, восполнение запасов гликогена и липидов в организме и поддержание постоянства состава белков и нуклеиновых кислот. Однако кроме этих, общих для всех клеток, процессов метаболизма для разных органов характерны биохимические различия, связанные с участием этих органов в той или иной функции организма и со способом использования ими энергии АТР. Как мы уже видели, печень играет центральную роль в обработке и распределении питательных веществ и через кровь снабжает ими в надлежащих пропорциях все остальные органы и ткани. Рассмотрим теперь метаболические характеристики других важнейших органов и тканей, а также способы использования ими энергии АТР.

24.7. Скелетные мышцы используют АТР для выполнения по мере надобности механической работы

На долю скелетных мышц в целом приходится более 50% кислорода, потребляемого организмом человека в состоянии покоя, и до 90% – при интенсивной мышечной работе. Обмен веществ в скелетных мышцах направлен в первую очередь на выработку АТР как непосредственного источника энергии для сокращения и расслабления. Кроме того, скелетные мышцы приспособлены к тому, чтобы выполнять механическую работу не непрерывно, а по мере надобности. Иногда, например при беге спринтера на 100 м, скелетные мышцы выполняют огромную работу за очень короткое время.

В качестве топлива скелетные мышцы в зависимости от степени их активности используют глюкозу, свободные жирные кислоты или кетоновые тела. В *покоящихся мышцах* основными субстратами энергетического обмена служат свободные жирные кислоты и кетоновые тела, доставляемые с кровью из печени. Эти субстраты подвергаются окислению и распаду до ацетил-СоА, который вступает далее в цикл лимонной кислоты и окисляется до CO_2. Сопутствующий перенос электронов к кислороду обеспечивает энергией процесс окислительного фосфорилирования и превращение ADP в АТР. *При умеренной нагрузке* в дополнение к жирным кислотам и кетоновым телам мышцы используют еще и глюкозу крови. При этом глюкоза подвергается фосфорилированию и распадается в ходе гликолиза до пирувата, который далее через ацетил-СоА окисляется в цикле лимонной кислоты. Наконец, при *максимальной мышечной нагрузке* расход АТР на сокращение настолько велик, что скорость доставки субстратов (топлива) и кислорода кровью оказывается недостаточной. В этих условиях в ход идет накопленный в самих мышцах гликоген, который расщепляется до лактата путем анаэробного гликолиза; при этом на один расщепившийся остаток глю-

козы образуются две молекулы АТР (разд. 15.7,ж). Таким образом, анаэробный гликолиз дает дополнительное количество АТР сверх того основного количества, которое вырабатывается при аэробном окислении других субстратов энергетического обмена в цикле лимонной кислоты. Использование глюкозы крови и гликогена мышц как срочно мобилизуемого топлива для мышечной работы резко возрастает при увеличении секреции адреналина, который в печени стимулирует образование из гликогена глюкозы, поступающей в кровь, а в мышечной ткани расщепление гликогена до лактата (гл. 25). Поскольку в скелетных мышцах нет глюкозо-6-фосфатазы, мышечный гликоген предназначен только для выработки энергии гликолитическим путем.

Запасы гликогена в мышцах, однако, невелики, и потому существует верхний предел того количества энергии, которое вырабатывается в ходе гликолиза в условиях максимальной (например, при спринте) нагрузки. Более того, накопление молочной кислоты и связанное с этим снижение pH, а также повышение температуры, происходящее при очень высокой мышечной активности, снижают эффективность обмена в мышцах. Так, в период восстановления после максимальной мышечной нагрузки атлет продолжает еще некоторое время тяжело дышать. Потребляемый при этом дополнительный кислород используется для окисления пирувата, лактата и других субстратов, а также регенерации АТР и фосфокреатина в мышцах. Одновременно лактат крови превращается в печени путем глюконеогенеза в поступающую в кровь глюкозу, которая попадает в мышцы и используется на восстановление запасов гликогена (разд. 20.1). Таким образом, дополнительно потребленный кислород («кислородный долг») восстанавливает нормальное метаболическое состояние организма посредством целой серии процессов, в ходе которых происходит взаимодействие мышц и печени (рис. 24-12).

Есть и другой путь, который обеспечивает скелетные мышцы максимальным количеством АТР в критических обстоятельствах. В мышцах содержится значительное количество *фосфокреатина* (разд. 14.15), который с помощью креатинкиназы способен быстро восполнять отщепившиеся при мышечном сокращении концевые фосфатные группы АТР:

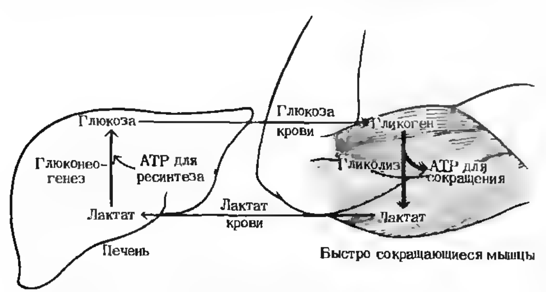


Рис. 24-12. Взаимосвязь обмена веществ в скелетных мышцах и в печени. При тяжелой физической нагрузке источником энергии для скелетных мышц служит гликоген, распадающийся гликолитическим путем. В восстановительный период часть образовавшегося в мышцах лактата переносится в печень и превращается в глюкозу, которая поступает в кровь и доставляется в мышцы, где используется для восполнения запасов гликогена.

$$\text{Фосфокреатин} + \text{ADP} \underset{Mg^{2+}}{\overset{Mg^{2+}}{\rightleftarrows}} \text{Креатин} + \text{ATP}.$$

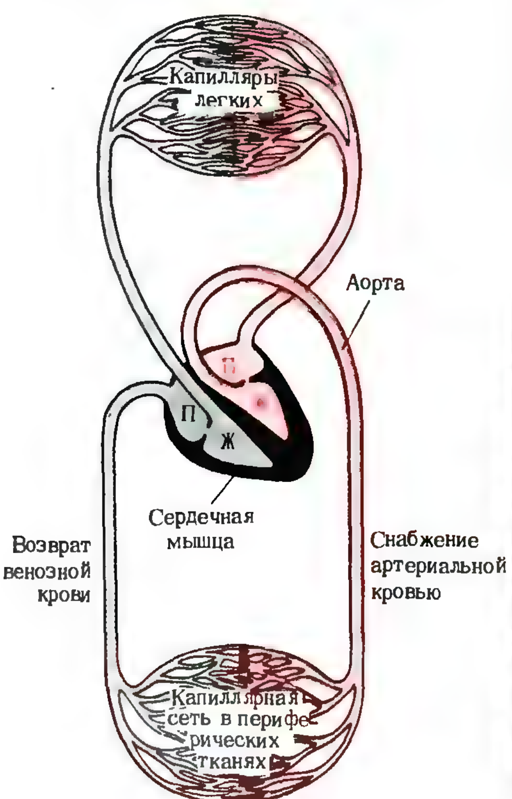
В периоды высокой сократительной активности и интенсивного гликолиза реакция сильно смещена вправо, тогда как в период восстановления происходит ресинтез фосфокреатина из креатина за счет АТР.

АТР в скелетных мышцах нужен не только для того, чтобы обеспечивать скольжение нитей актина вдоль нитей миозина, или толстых нитей (разд. 14.14), но также и для расслабления. Мышечное сокращение инициируется импульсом, поступающим от двигательного нерва; этот импульс передается на поперечные трубочки и на саркоплазматический ретикулум, из которого в саркоплазму выходят ионы Ca^{2+}. Далее Ca^{2+} связывается с *тропонином* – регуляторным белком, который преобразует этот сигнал

в процесс скольжения актиновых нитей за счет энергии ATP. После прекращения подачи импульсов со стороны двигательного нерва ионы Ca^{2+} должны быть удалены из саркоплазмы, чтобы могло произойти расслабление мышцы. Это достигается транспортом ионов Ca^{2+} обратно в саркоплазматический ретикулум с помощью Ca^{2+}-транспортирующей мембранной АТРазы. Перенос двух ионов Ca^{2+} внутрь саркоплазматического ретикулума происходит за счет гидролиза одной молекулы ATP, т.е. на расслабление скелетной мышцы тратится почти столько же энергии, сколько на ее сокращение.

24.8. Сердечная мышца должна работать постоянно и ритмически

Сердечная мышца, так же как и скелетная, содержит нити актина и миозина. Для ее работы характерно постоянное ритмическое чередование процессов сокращения и расслабления. Хотя при некоторых обстоятельствах сердце должно работать сильнее и быстрее, чем обычно, например при повышении потребности организма в кислороде или при стимуляции адреналином (гл. 25), все же диапазон, в котором может меняться количество совершаемой сердцем работы, не так широк, как в случае скелетных мышц. Кроме того, сердцу свойствен постоянно идущий полностью аэробный обмен, тогда как скелетные мышцы в течение короткого времени могут функционировать за счет анаэробных процессов. В сердечной мышце по сравнению со скелетной намного больше митохондрий: они занимают почти половину объема клетки (рис. 24-13). В качестве топлива сердце использует смесь глюкозы, свободных жирных кислот и кетоновых тел,



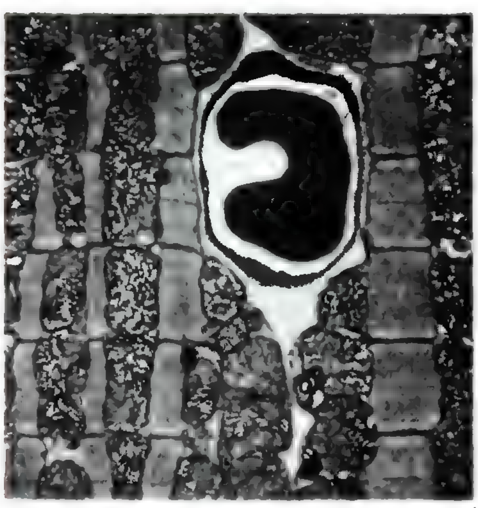


Рис. 24-13. *А*. Схема системы кровообращения. *П* – предсердие, *Ж* – желудочек сердца (два типа камер в сердце). Сердце человека перекачивает кровь со скоростью 5 л/мин, или 300 л/ч, или $1,8 \cdot 10^8$ л за 70 лет жизни. *Б*. Электронная микрофотография сердечной мышцы; видно обилие митохондрий. В центре – просвет капилляра и в нем один эритроцит.

доставляемых кровью. Эти субстраты окисляются в цикле лимонной кислоты, поставляя энергию для образования АТР в ходе окислительного фосфорилирования. Сердечной мышце, так же как и скелетным мышцам, не свойственно накопление больших количеств липидов или гликогена. Небольшое количество резервной энергии запасается в форме фосфокреатина. Каждое сокращение сердечной мышцы инициируется нервным импульсом, под действием которого свободные ионы Ca^{2+} поступают в цитозоль, омывающий миофибриллы; обратный процесс – расслабление – обеспечивается зависимым от АТР поглощением ионов Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом. Поскольку для сердца в нормальных условиях характерен аэробный обмен и оно получает почти всю энергию за счет окислительного фосфорилирования, недостаточность кислорода в каком-то участке сердечной мышцы, где кровеносные сосуды оказались заблокированы отложениями липидов (разд. 21.16), может привести к прекращению кровоснабжения и некрозу этого участка, т. е. к процессу, известному как *инфаркт миокарда*.

24.9. Мозг использует энергию для передачи импульсов

Метаболизм мозга примечателен в ряде отношений. Во-первых, в качестве клеточного топлива мозг взрослых млекопитающих обычно использует только глюкозу. Во-вторых, мозгу свойствен очень интенсивный дыхательный обмен; так, у взрослого человека мозгом используется почти 20% кислорода, потребляемого организмом в состоянии покоя. Кроме того, скорость использования кислорода мозгом отличается большим постоянством и не претерпевает существенных изменений при переходе, например, от активной умственной работы ко сну. Из-за низкого содержания гликогена мозг нуждается в постоянной доставке глюкозы кровью. Если концентрация глюкозы в крови даже на короткий период времени оказывается существенно ниже определенного критического уровня, то могут возникнуть тяжелые и иногда необратимые нарушения функции мозга. Именно поэтому хирургические операции на мозге возможны только при условии, что обеспечено его бесперебойное снабжение глюкозой крови.

Хотя мозг не может прямо использовать свободные жирные кислоты или липиды крови в качестве клеточного топлива, однако он утилизирует доставляемый кровью β-гидроксибутират, образующийся в печени из жирных кислот. Способность мозга окислять β-гидроксибутират через промежуточное образование ацетил-СоА (разд. 18.10) приобретает особо важное значение при продолжительном голодании, когда практически весь гликоген печени оказывается израсходованным; в этих условиях мозг переходит на использование в качестве источника энергии имеющихся в организме жиров. Запасы жира в организме намного превышают запасы гликогена; при голодании запасов гликогена хватает всего лишь на несколько дней. Использование мозгом β-гидроксибутирата во время голодания позволяет также сохранить белки мышц, которые – через процесс глюконеогенеза – служат для мозга последним источником глюкозы при голодании.

Глюкоза используется мозгом в ходе гликолиза и в цикле лимонной кислоты; распад глюкозы обеспечивает почти весь запас АТР мозга. За счет энергии АТР нервные клетки (нейроны) поддерживают электрический потенциал на плазматической мембране и, в частности, на мембране, окружающей их длинные отростки – *аксоны* и *дендриты*, образующие «линии передач» в нервной системе. Передача нервных импульсов вдоль нейронов происходит посредством волнообразного изменения электрических свойств мембраны, т. е. так называемого *потенциала действия*. Na^+, K^+-АТРаза плазматической мембраны (разд. 14.16) нуждается в постоянном притоке энергии АТР для накачивания ионов K^+ внутрь аксонов и выведения ионов Na^+ из аксонов (рис. 24-14). За счет энергии гидролиза одной молекулы АТР три иона Na^+

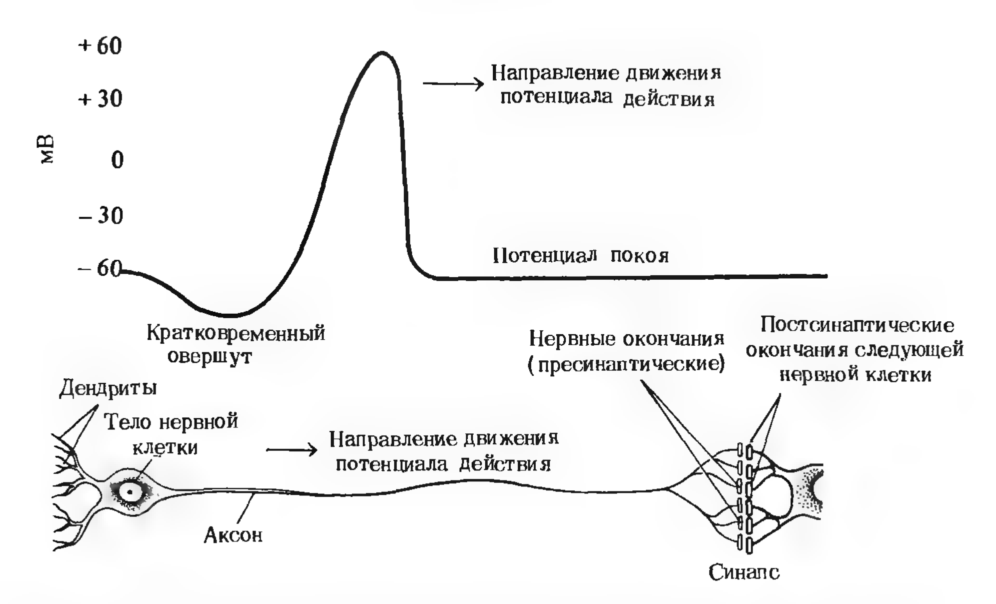
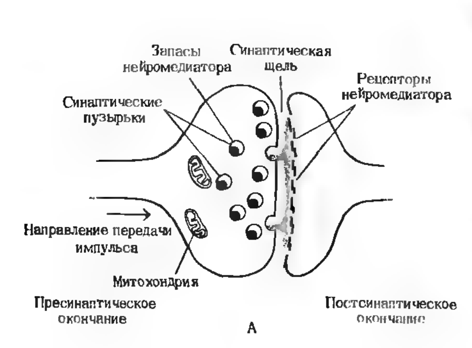


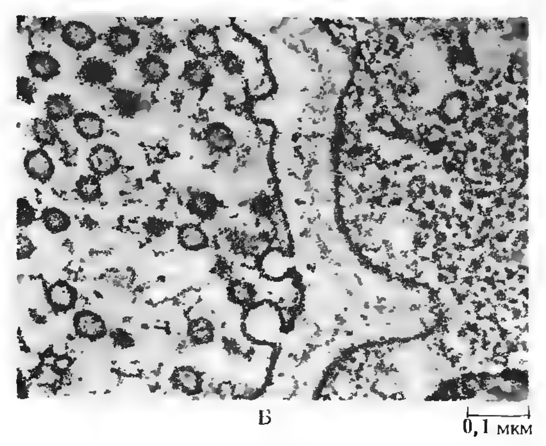
Рис. 24-14. Нейрон и потенциал действия. Поступающие на дендриты импульсы передаются вдоль аксона к следующему нейрону. Потенциал покоя обычно равен −60 мВ (отрицательный заряд–на внутренней стороне мембраны). Изменение знака заряда происходит вследствие быстрого тока ионов Na^+ из внеклеточного пространства внутрь клетки, обусловленного избирательным открытием Na^+-каналов. Восстановление потенциала покоя обеспечивается действием Na^+, K^+-транспортирующей АТРазы, локализованной в мембране аксона.

выводятся наружу, а два иона K^+ поступают внутрь аксона. Такой дисбаланс электрических зарядов служит причиной того, что Na^+, K^+-АТРаза генерирует разность потенциалов на мембране аксонов, причем обычно наружная сторона мембраны заряжена положительно.

Большое количество АТР в мозгу используется для синтеза нейромедиаторов – веществ, которые передают импульсы с одного нейрона на другой через синапсы, т. е. через участки контакта между последовательно расположенными нервными клетками. Известно большое число как нейромедиаторов, так и веществ, ингибирующих передачу импуль-

Рис. 24-15. *А*. Схема синапса, на которой показаны его основные функциональные компоненты. Митохондрии вырабатывают АТР, необходимый для концентрирования нейромедиатора в секреторных везикулах, а также энергию, используемую для обратного всасывания нейромедиатора из синаптической щели. *Б*. Электронная микрофотография, на которой видно высвобождение нейромедиаторов из секреторных везикул в нервно-мышечное соединение.





сов; каждое из них специфично в отношении того или иного типа нейронов либо определенных участков мозга. К числу таких веществ относятся *глутамат, глутамин, аспартат, глицин* и *γ-аминобутират*. В качестве нейромедиаторов либо ингибиторов могут функционировать производные других аминокислот, а также некоторые пептиды и *ацетилхолин*. Нейромедиаторы накапливаются в специальных везикулах (пузырьках) в пресинаптических нервных окончаниях (рис. 24-15). В ответ на потенциал действия, возникший на мембране аксона, содержимое отдельных пузырьков изливается в синаптическую щель и связывается со специфическими рецепторными участками в чувствительном окончании постсинаптического нейрона, тем самым стимулируя его к дальнейшей передаче импульса. После стимуляции постсинаптического нейрона высвобожденный в синаптическую щель нейромедиатор должен быть либо быстро разрушен ферментами, либо реабсорбирован в пресинаптическое нервное окончание, иначе синапс не будет способен к проведению следующего импульса. Ферментативная инактивация нейромедиатора ацетилхолина осуществляется в синаптической щели с помощью *ацетилхолинэстеразы*, гидролизующей этот медиатор до ацетата и свободного холина (разд. 9.12).

24.10. Жировой ткани присущ активный обмен веществ

Жировая ткань, состоящая из жировых клеток, или *адипоцитов* (рис. 24-16), аморфна и распространена по всему организму: она имеется под кожей, вокруг глубоко расположенных кровеносных сосудов, в брюшной полости. Общее количество жировой ткани у взрослого молодого мужчины среднего веса составляет около 20 кг, т.е. почти равно общей мышечной массе. Примерно 65% веса жировой ткани приходится на долю отложенных в запас триацилглицеролов. Хотя жировая ткань кажется на первый взгляд инертной, однако в действительности она обладает очень высокой метаболической активностью. Так, жировая ткань быстро



Рис. 24-16. Фотография клеток жировой ткани (адипоцитов), полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. Адипоциты окружены в жировой ткани поддерживающей сетью, состоящей из кровеносных капилляров и коллагеновых волокон. Адипоциты заполнены капельками жира, активно участвующего в обмене веществ.

реагирует на метаболические и гормональные стимулы и принимает участие в том активном взаимодействии, которое существует между печенью, скелетными мышцами и сердцем.

Так же как в клетках других типов, в клетках жировой ткани (адипоцитах) активно идет гликолиз, в цикле лимонной кислоты окисляются пируват и жирные кислоты и протекает окислительное фосфорилирование. При обильном поступлении углеводов в организм глюкоза в жировой ткани превращается в жирные кислоты через промежуточное образование пирувата и ацетил-СоА; жирные кислоты идут на образование триацилглицеролов, которые накапливаются в виде больших жировых глобул (рис. 24-16). В этом процессе превращения глюкозы в жиры восстановителем служит NADPH, который генерируется в пентозофосфатном цикле, а также

яблочным ферментом (малатдегидрогеназой; разд. 21.5,г).

Адипоциты активно накапливают также триацилглицеролы, поступающие из желудочно-кишечного тракта в виде хиломикронов (разд. 12.8 и 24.1,в), особенно после приема жирной пищи. Хиломикроны, достигающие жировой ткани, подвергаются действию липопротеинлипазы, локализованной в клетках кровеносных капилляров. Этот фермент отщепляет одну или несколько жирных кислот от триацилглицеролов в хиломикронах. Высвобожденные липопротеинлипазой жирные кислоты поглощаются далее клетками жировой ткани, где ферментативным путем превращаются в триацилглицеролы и таким образом откладываются в запас. Однако жирные кислоты, высвобожденные липопротеинлипазой в капиллярах скелетных мышц и сердца, служат этим органам топливом и окисляются в них. Теряя триацилглицеролы по мере их расщепления липопротеинлипазой, хиломикроны крови уменьшаются в размерах, но в них сохраняются фосфолипиды, эфиры холестерола и белки. Эти остаточные структуры – остатки хиломикронов – выводятся из кровяного русла, поступая в печень. Триацилглицеролы, накопленные в клетках жировой ткани, не подвергаются действию липопротеинлипазы, локализованной в клетках кровеносных капилляров, но они гидролизуются под действием внутриклеточных липаз: высвобождающиеся при этом жирные кислоты могут далее поступать в кровь, где связываются сывороточным альбумином.

Каждая молекула сывороточного альбумина способна очень прочно связать две молекулы длинноцепочечной жирной кислоты и менее прочно – еще одну или две молекулы. Поскольку сывороточный альбумин находится в плазме крови в очень высокой концентрации, он служит основным переносчиком жирных кислот в крови. В связанной с альбумином форме жирные кислоты доставляются в скелетные мышцы и сердце, где в основном и используются.

Скорость высвобождения жирных кислот из адипоцитов резко возрастает под влиянием гормона *адреналина* (гл. 25), который связывается с рецепторами на поверхности клеток и способствует превращению неактивной формы липазы адипоцитов в активную посредством фосфорилирования. Связывание инсулина на поверхности жировых клеток снимает эффект адреналина и понижает активность липазы адипоцитов.

Встречаются случаи генетической недостаточности липопротеинлипазы. У больных с такой недостаточностью после приема жирной пищи хиломикроны остаются в кровяном русле в течение длительного периода. Триацилглицеролы, которые не могут использоваться должным образом из-за недостатка липопротеинлипазы, откладываются в виде желтых, наполненных липидами утолщений под кожей. При генетических дефектах других типов нарушается обмен того или иного вида липопротеинов плазмы. Создается впечатление, что атеросклероз и инфаркт миокарда чаще бывает у людей с избыточным содержанием триацилглицеролов в крови.

У человека, так же как и у многих животных, особенно тех, которые впадают в спячку, имеется специализированный тип жировой ткани, называемый бурым жиром (рис. 24-17). Наличие такой ткани особенно характерно для новорожденных, у которых она раполагается на шее, в верхней части груди и спины. Цвет бурого жира обусловлен присутствием большого числа митохондрий, богатых цитохромами (разд. 17.17). Бурый жир специализирован для выработки тепла, а не ATP при окислении жирных кислот. Внутренние мембраны митохондрий в бурой жировой ткани содержат специфические поры, через которые осуществляется перенос ионов H^+, причем их способность переносить ионы H^+ регулируется. Через эти поры ионы H^+, выкачиваемые из митохондрий во время транспорта электронов (разд. 17.15,е), могут возвращаться в дышащие митохондрии; в итоге наблюдается «холостая» циркуляция ионов H^+ и вместо образования ATP происходит выделение энергии в виде тепла (разд. 17.17). Если организм не нуждается в тепле, то H^+-

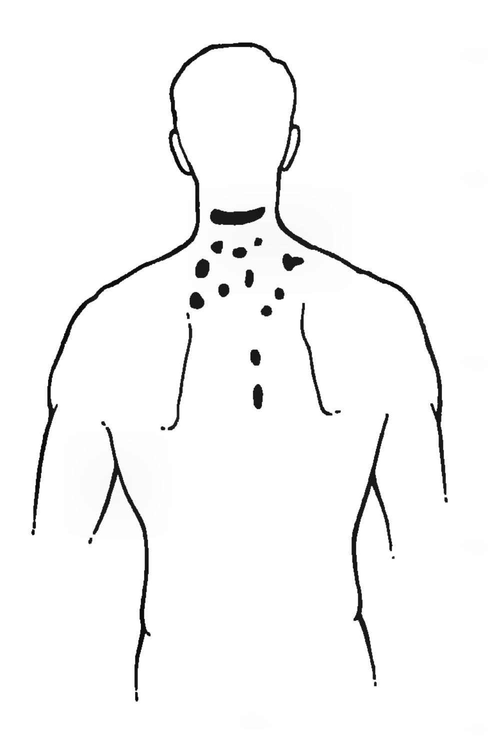


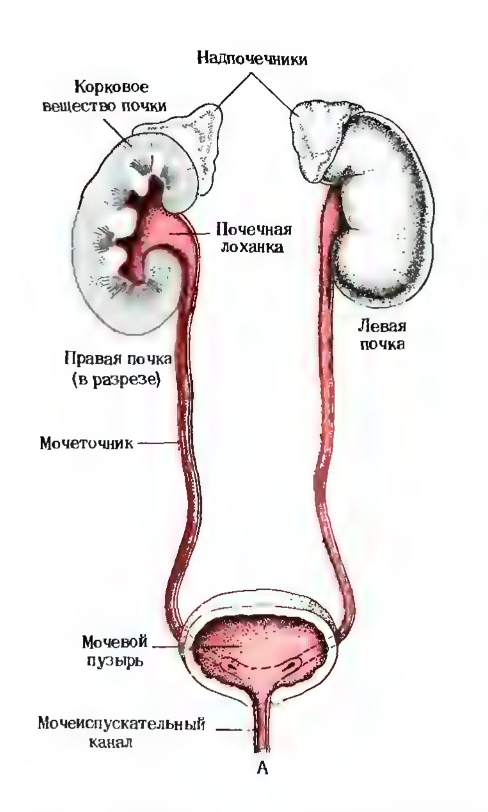
Рис. 24-17. Локализация бурого жира (показан красным цветом) в области шеи и спины у взрослого человека.

поры закрываются и митохондрии бурой жировой ткани вновь образуют ATP.

24.11. Почки используют ATP для выполнения осмотической работы

Почки характеризуются очень интенсивным дыхательным метаболизмом и значительной гибкостью обмена веществ. В качестве клеточного топлива они могут использовать глюкозу, кетоновые тела, свободные жирные кислоты и аминокислоты, расщепляя эти субстраты в конечном итоге в цикле лимонной кислоты с последующей наработкой ATP в ходе окислительного фосфорилирования. Бóльшая часть энергии ATP расходуется на образование мочи, которое идет в два этапа. На первом этапе происходит фильтрация плазмы крови через микроскопические структуры, называемые *клубочками*, или *гломерулами*, которые расположены в корковом наружном слое почек (рис. 24-18). Через гломерулы проходят все компоненты плазмы крови, за исключением белков и их лигандов. Фильтрат попадает в длинные протоки – почечные канальца, выстланные эпителиальными клетками, осуществляющими ATP-зависимый активный транспорт определенных ионов и метаболитов из содержимого канальцев в кровь окружающих их капилляров. По мере того как фильтрат плазмы проходит вниз по почечным канальцам, происходит обратное всасывание (реабсорбция) воды в кровь капилляров, окружающих канальца. В итоге по мере продвижения по канальцам гломерулярный фильтрат концентрируется и одновременно меняется его состав. Каждый миллилитр готовой мочи, поступающей в мочевой пузырь, образуется из 50–100 мл гломерулярного фильтрата. Гормон задней доли гипофиза вазопрессин (гл. 25) ускоряет реабсорбцию воды из канальцев. Состав мочи здорового человека приведен в табл. 24-2.

Некоторые компоненты, в частности глюкоза, в норме содержатся в моче в меньшей концентрации, чем в крови. Это объясняется тем, что относящиеся к этой группе вещества подвергаются обратному всасыванию из гломерулярного фильтрата в кровь против градиента концентрации благодаря действию ATP-зависимых систем мембранного транспорта. Вторая группа компонентов, включающая ионы NH_4^+, K^+ и фосфат, содержится в моче в относительно высокой концентрации по сравнению с кровью; эти компоненты активно транспортируются из крови в почечные канальца также против градиента концентрации. Вещества третьей группы, включающей *мочевину* и *креатинин* – конечный продукт распада фосфокреатина,– не подвергаются реабсорбции, и их концентрация в моче возрастает по мере ее прохождения по почечным канальцам. Особый случай представляют ионы Na^+. Эти ионы реабсорбируются путем активного транспорта из гломерулярного фильтрата в кровь в верхней части канальцев, однако в последующем часть ионов натрия опять поступает



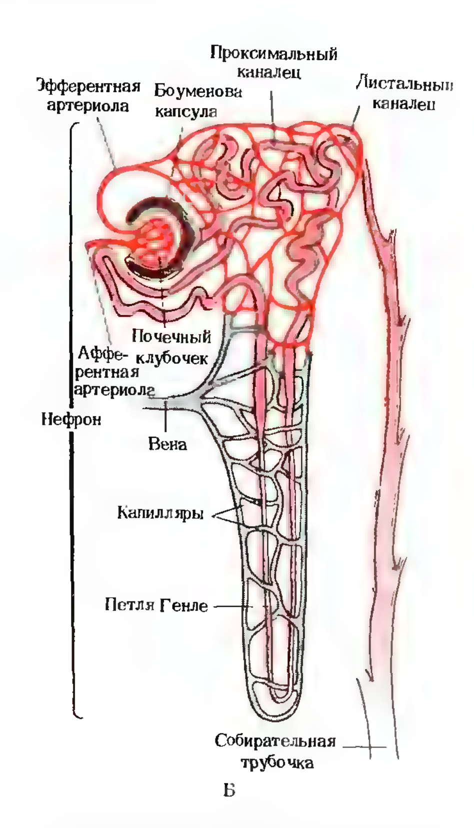


Рис. 24-18. *А*. Почки содержат большое число функциональных единиц, называемых нефронами. Моча из отдельных нефронов попадает в почечную лоханку и далее по мочеточникам поступает в мочевой пузырь. *Б*. Схематическое изображение нефрона. Плазма крови фильтруется через клубочки (гломерулы). Фильтрат попадает в боуменову капсулу и затем течет вниз по длинному почечному канальцу, выстланному эпителиальными клетками. Моча в канальце постепенно концентрируется путем удаления воды в окружающие его кровеносные капилляры. Ряд веществ, например глюкоза, подвергается обратному всасыванию в кровь, тогда как другие выделяются в мочу, причем в обоих случаях перенос веществ идет против градиента концентрации. Эти процессы активного транспорта требуют большого расхода АТР клетками почечных канальцев.

в мочу в результате вторичного обмена на другие катионы.

Транспорт ионов Na^+ и K^+ играет особо важную роль в почках, поскольку именно почки поддерживают требуемые концентрации этих жизненно необходимых катионов в организме путем сохранения ионов Na^+ и выделения ионов K^+. Практически все клетки млекопитающих содержат ионы K^+ в относительно высокой концентрации, а ионы Na^+ в относительно низкой. В то же время в плазме крови и в большинстве других внеклеточных жидкостей концентрация ионов Na^+ значительно превышает концентрацию ионов K^+ (рис. 24-19). В плазматической мембране большинства клеток содержится Na^+, K^+-АТРаза (разд. 14.16), которая переносит ионы K^+ внутрь клетки и одновременно выводит ионы Na^+ наружу. Этот энергозависимый процесс сопряжен с гидролизом находящейся в цитозоле АТР на ADP и фосфат. Na^+, K^+-АТРаза клеток почечных канальцев обеспечивает постоянное выведение ионов K^+ в мочу; при этом потеря ионов Na^+ незначительна даже в условиях, когда в организм поступает очень мало Na^+ (см. также гл. 26).

Благодаря действию Na^+, K^+-АТР-азы, а также других энергозависимых систем транспорта глюкозы и аминокислот через мембрану образова-

Таблица 24-2. Основные компоненты мочи человека [1]

Компонент	Граммы за 24 ч	Приблизительное отношение концентрации в моче к концентрации в плазме
Глюкоза	< 0,05	< 0,05
Аминокислоты	0,80	1,0
Аммиак	0,80	100
Мочевина	25	70
Креатинин	1,5	70
Мочевая кислота	0,7	20
H^+	pH 5–8	До 300
Na^+	3,0	1,0
K^+	1,7	15
Ca^{2+}	0,2	5
Mg^{2+}	0,15	2
Cl^-	6,3	1,5
HPO_4^{2-}	1,2 г P	25
SO_4^{2-}	1,4 г S	50
HCO_3^-	0–3	0–2

[1] Объем и состав суточной мочи сильно меняются в зависимости от количества потребленной жидкости и характера питания. В таблице приведен состав обычного образца суточной мочи общим объемом 1200 мл.

ние мочи происходит так, что выводятся те вещества, концентрацию которых в крови нужно понизить, и реабсорбируются из почечных канальцев те вещества, которые необходимы для поддержания требуемого состава крови. На эти процессы активного мембранного транспорта расходуется больше трех четвертей того количества ATP, которое генерируется в почках в ходе окислительного фосфорилирования.

24.12. Кровь имеет очень сложный состав

Через кровь осуществляется взаимосвязь обмена веществ разных органов тела. Кровь переносит питательные вещества из тонкого кишечника в печень и другие органы, а отработанные шлаки транспортирует в почки для последующего выведения их из организма. Кровь доставляет также кислород от легких к тканям и переносит CO_2, образующуюся в качестве конечного продукта дыхания тканей, в легкие. Кроме того, гормоны, функционирующие как химические посредники (гл. 25), транспортируются кровью от эндокринных желез к специфическим органам-мишеням. Химический состав крови очень сложен, так как она содержит большое число разнообразных

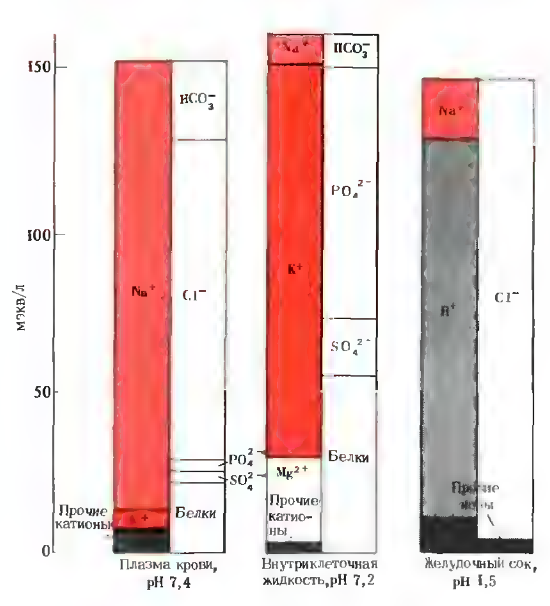


Рис. 24-19. Сравнение электролитного состава плазмы крови, внутриклеточной жидкости и желудочного сока. Левые столбики в каждой из пар характеризуют катионный состав, а правые анионный. Темно-серые участки соответствуют сумме минорных компонентов (т.е. катионов, содержащихся в незначительных количествах). Обратите внимание на большую разницу в содержании ионов Na^+ и K^+ между плазмой крови и внутриклеточной жидкостью. Градиенты этих ионов поддерживаются Na^+, K^+-АТРазой, содержащейся в плазматических мембранах почти всех клеток в организме. Аналогичным образом существует высокий градиент ионов H^+ между желудочным соком и плазмой крови, из которой образуется желудочный сок. Этот градиент возникает в результате действия H^+-транспортирующей АТРазы в обкладочных клетках желудка.

Рис. 24-20. Состав крови. Цельную кровь разделяют путем центрифугирования на плазму и клетки. Около 10% плазмы крови приходится на долю растворенных в ней твердых веществ, из которых около 70% составляют белки плазмы, около 10% – неорганические соли и около 20% – низкомолекулярные органические соединения. Основные компоненты каждой из фракций представлены справа. Количественный состав неорганических компонентов плазмы крови приведен на рис. 24–19, белков плазмы – в табл. 24-3 и небелковых органических веществ – в табл. 24-4. В плазме крови содержатся также липиды в количестве приблизительно 700 мг на 100 мл, которые связаны с α- и β-глобулинами (табл. 24-3). Кровь содержит и многие другие соединения, часто в следовых количествах; к их числу относятся промежуточные продукты метаболизма, гормоны, витамины, микроэлементы и желчные пигменты. Измерения концентрации отдельных компонентов в плазме крови играют важную роль в диагностике заболеваний и наблюдений за ходом лечения.

питательных веществ, промежуточных продуктов обмена, отработанных шлаков и неорганических ионов, но именно это и позволяет ей координировать взаимодействие процессов метаболизма в различных органах и объединять их в единую систему.

Объем крови в кровеносной системе взрослого человека составляет приблизительно 5–6 л. Почти половина этого объема приходится на долю эритроцитов (красных кровяных клеток), значительно меньшая часть – на долю лейкоцитов (белых кровяных клеток) и тромбоцитов (рис. 24-20). Жидкая часть крови, *плазма*, состоит на 90% из воды и на 10% из растворенных веществ. Свыше 70% сухого

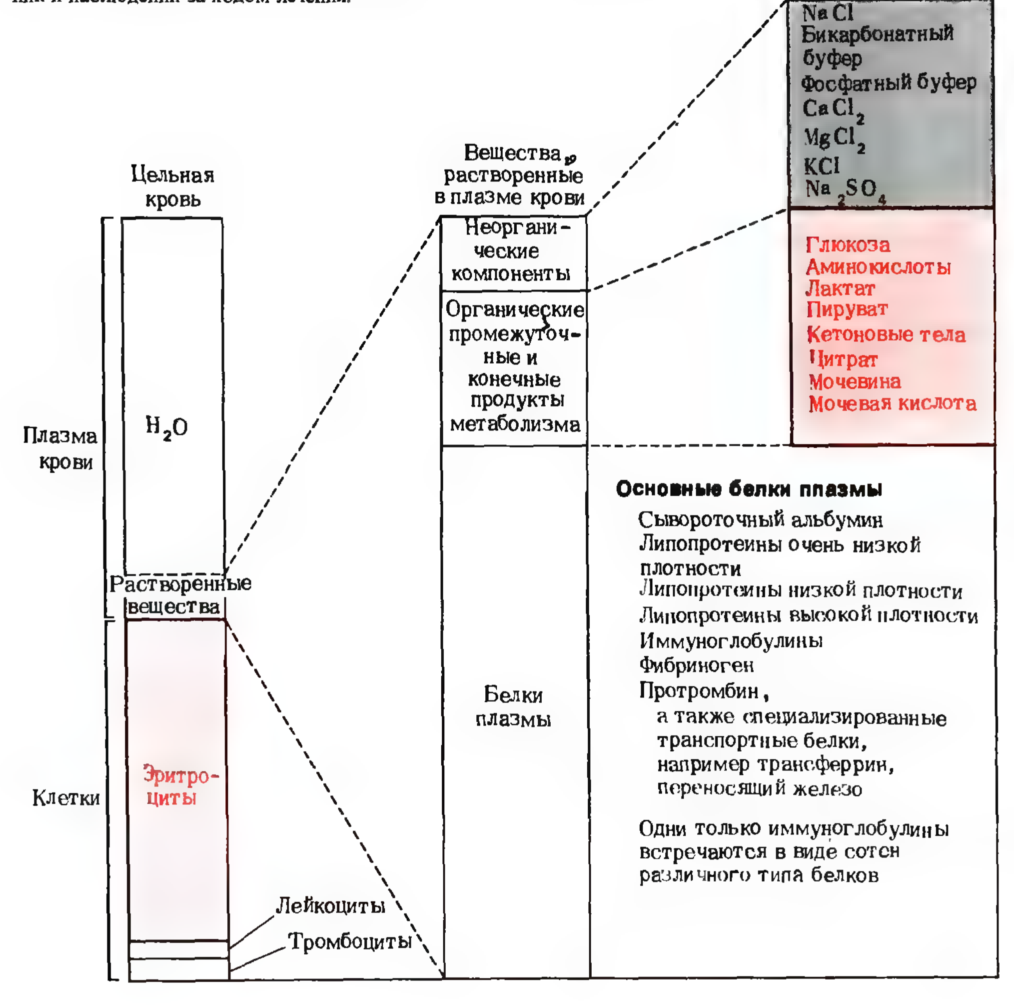


Таблица 24-3. Основные фракции белков плазмы[1]

Белок	Количество, мг/100 мл	Мол. масса	Функция
Сывороточный альбумин	3500–4500	66 000	Регуляция объема крови; транспорт жирных кислот
α_1-Глобулины	300–600	40 000–60 000	Транспорт липидов, тироксина, гормонов коры надпочечников
α_2-Глобулины	400–900	100 000–400 000	Транспорт липидов, меди
β-Глобулины	600–1 100	110 000–120 000	Транспорт липидов, железа, гемов, иммунная активность (антитела)
γ-Глобулины	700–1500	150 000–200 000	Большая часть циркулирующих антител
Фибриноген	3000	340 000	Предшественник фибрина кровяных сгустков
Протромбин	100	69 000	Предшественник тромбина, необходимого для свертывания крови

[1] Общее содержание белков плазмы – 7000–7500 мг/100 мл. В плазме крови обнаруживается большое разнообразие белков; в таблице приведены лишь основные их классы.

остатка плазмы составляют *белки плазмы* (табл. 24-3). Приблизительно 20% приходится на долю органических промежуточных продуктов обмена (метаболитов), транспортируемых от одних органов к другим, и на конечные продукты обмена – мочевину и мочевую кислоту, которые, попадая в почки, выделяются из организма с мочой (табл. 24-4). Остальные 10% сухого остатка плазмы составляют неорганические соли. На рис. 24-20 перечислены основные вещества, растворенные в плазме крóви человека.

В нормальных условиях концентрации ряда компонентов в крови могут колебаться в определенных пределах в зависимости от характера питания, а также от того, в какой момент времени взята кровь для анализа. Так, концентрация глюкозы в крови достигает максимума сразу же после еды, особенно если пища была богата углеводами, а спустя несколько часов этот показатель может быть ниже среднего уровня. Аналогичным образом, концентрация хиломикронов в крови подвержена колебаниям в промежутках между приемами пищи. Содержание отдельных компонентов в плазме крови поддерживается на относительно постоянном уровне с помощью различных регуляторных систем (гл. 25).

Таблица 24-4. Концентрации основных небелковых органических компонентов плазмы крови

Компонент	Границы колебаний в норме, мг/100 мл
Азотсодержащие вещества	
Мочевина	20–30
Аминокислоты	35–65
Мочевая кислота	2–6
Креатинин	1–2
Углеводы	
Глюкоза	70–90
Фруктоза	6–8
Органические кислоты	
Кетоновые тела	1–4
Лактат	8–17
Пируват	0,4–2,5
Цитрат	1,5–3,0

Компонент	Границы колебаний в норме, мг/100 мл
Липиды (полностью связанные с белками – α- и β-глобулинами)	
Общее количество липидов	300–700
Триацилглицеролы	80–240
Холестерол и его эфиры	130–260
Фосфолипиды	160–300

24.13. Кровь переносит большие объемы кислорода

Нормальный взрослый мужчина в состоянии полного покоя потребляет около 375 л чистого кислорода в сутки, что эквивалентно количеству кислорода, содержащемуся в 1900 л воздуха. При сидячей работе потребность в кислороде возрастает по крайней мере вдвое. У тренированного спортсмена во время соревнований по бегу или плаванию скорость потребления кислорода превышает уровень покоя иногда в 10 раз. В табл. 24-5 приведены относительные количества кислорода, потребляемые основными органами тела взрослого человека в состоянии покоя и при большой мышечной нагрузке.

Таблица 24-5. Потребление кислорода (в относительных величинах) основными органами тела человека (взрослого мужчины)

	Покой	Легкая физическая работа	Тяжелая физическая работа
Скелетные мышцы	0,30	2,05	6,95
Органы брюшной полости	0,25	0,24	0,24
Сердце	0,11	0,23	0,40
Почки	0,07	0,06	0,07
Мозг	0,20	0,20	0,20
Кожа	0,02	0,06	0,08
Прочие	0,05	0,06	0,06
Итого	1,00	2,90	8,00

Как мы уже видели (разд. 8.12 и далее), большая часть кислорода переносится гемоглобином эритроцитов. Эти клетки образуют важнейшую «ткань» тела человека, поскольку их общий объем составляет 3 л (у взрослого мужчины), а общий вес почти равен весу печени. Эритроциты представляют собой очень мелкие дегенеративные клетки, лишенные ядра, митохондрий и иных внутриклеточных органелл. В их собственном обмене кислород не используется. Относительно небольшое количество необходимого им ATP вырабатывается в ходе гликолитического превращения глюкозы, поступающей из крови, в лактат. Основная функция эритроцитов – транспорт O_2 из легких в ткани и участие в транспорте CO_2 из тканей в легкие. 35% массы эритроцита приходится на гемоглобин, который составляет 90% общего количества белка, содержащегося в клетке.

24.14. Гемоглобин – переносчик кислорода

Гемоглобин состоит из двух α- и двух β-полипептидных цепей и четырех гемовых групп, каждая из которых присоединена к полипептидной цепи (разд. 8.9, 8.10). Одна гемовая группа обратимо связывает одну молекулу молекулярного кислорода. Поскольку гемоглобин содержится в эритроцитах в большом количестве, в 100 мл цельной крови млекопитающего при полном насыщении кислородом транспортируется приблизительно 21 мл газообразного кислорода. Связывание кислорода гемоглобином зависит от четырех факторов: 1) парциального давления O_2; 2) pH; 3) концентрации 2,3-бисфосфоглицерата и 4) концентрации CO_2 (разд. 8.12–8.16). На рис. 24-21 приведены кривые насыщения гемоглобина кислородом. Сигмоидная форма этих кривых свидетельствует о том, что связывание первой молекулы

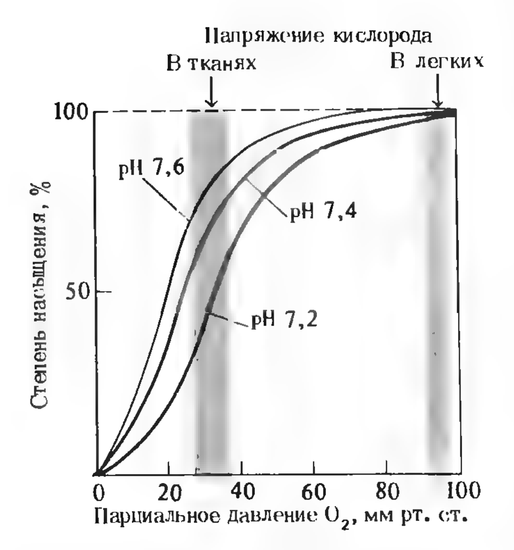


Рис. 24-21. Влияние pH на кривую насыщения гемоглобина кислородом. Свойственные тканям низкие значения pH способствуют высвобождению кислорода, тогда как более высокие значения pH в легких способствуют связыванию кислорода.

кислорода повышает способность остальных субъединиц гемоглобина связывать остальные три молекулы кислорода. При дальнейшем возрастании парциального давления кислорода кривые выходят на плато, которое соответствует полному насыщению гемоглобина кислородом, т. е. связыванию четырех молекул O_2 каждой молекулой гемоглобина. Обратимое связывание кислорода гемоглобином сопровождается высвобождением протонов в соответствии с уравнением

$$HHb^{+} + O_2 \rightleftarrows HbO_2 + H^{+}$$

Следовательно, с ростом pH равновесие должно сдвигаться вправо и при данном парциальном давлении связывание кислорода увеличится. Наоборот, при понижении pH связывание кислорода уменьшится.

В легких, где парциальное давление кислорода велико (90–100 мм рт. ст.) и величина pH относительно высока (до 7,6), гемоглобин насыщается кислородом почти в максимальной степени (рис. 24-21). Вместе с тем в капиллярах, пронизывающих периферические ткани, где напряжение кислорода невелико (25–40 мм рт. ст) и величина pH относительно низка (7,2–7,3), кислород высвобождается и поступает в дышащие ткани. В оттекающей от органов венозной крови гемоглобин насыщен кислородом только на 65%. Таким образом, при циркуляции крови между легкими и периферическими тканями степень насыщения гемоглобина кислородом циклически меняется от 65 до 97%.

Важным регулятором степени оксигенирования гемоглобина служит 2,3-бисфосфоглицерат (БФГ). Чем выше концентрация БФГ в клетке, тем ниже сродство гемоглобина к кислороду. В случаях когда доставка кислорода в ткани оказывается хронически недостаточной, как это бывает у людей с пониженным содержанием эритроцитов в крови или у обитателей высокогорья, концентрация БФГ в эритроцитах оказывается выше, чем у здоровых людей, живущих на уровне моря. Этот биохимический сдвиг способствует тому, что гемоглобин легче отдает тканям связанный кислород, и тем самым компенсируется снижение количества кислорода, связываемого гемоглобином в легких.

Измерения содержания кислорода в крови необходимы для диагностики и наблюдения за течением заболеваний, сопровождающихся нарушением транспорта кислорода кровью. К числу таких заболеваний относятся тяжелые *анемии*, при которых понижено число эритроцитов в крови либо содержание гемоглобина в эритроцитах; *астма*, при которой насыщение крови кислородом может быть снижено вследствие спазма бронхиол, а также *сердечная недостаточность*, при которой скорость перекачивания крови сердцем не обеспечивает достаточного снабжения тканей кислородом.

24.15. Эритроциты переносят также CO_2

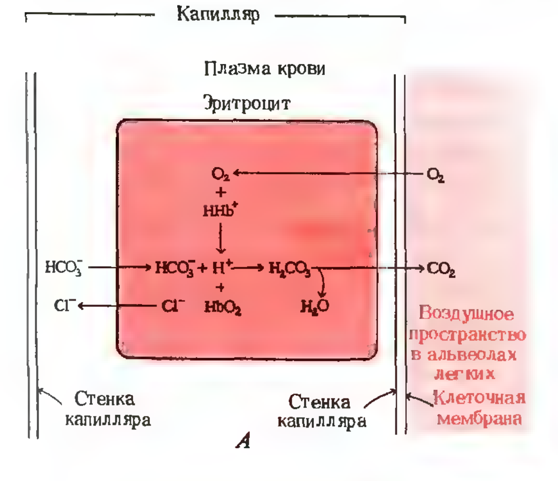
Образующаяся в тканях двуокись углерода также переносится кровью и попадает в легкие, откуда выводится с выдыхаемым воздухом. Содержание двуокиси

углерода в оттекающей от тканей венозной крови составляет приблизительно 60 мл газообразной CO_2 на 100 мл крови, тогда как артериальная кровь, оттекающая от легких, содержит приблизительно 50 мл CO_2 на 100 мл крови. Около двух третей общего количества CO_2 крови находится в плазме и около одной трети – в эритроцитах. Однако в процессе переноса CO_2 от тканей к легким почти вся CO_2 крови должна пройти через эритроциты (войти в эритроциты и выйти из них). Как в плазме, так и в эритроцитах CO_2 присутствует в двух формах: в виде растворенного газа и в виде бикарбоната (HCO_3^-). Поскольку растворенная CO_2 подвергается обратимому гидратированию с образованием угольной кислоты (H_2CO_3), смесь H_2CO_3 и HCO_3^- в крови образует буферную систему (разд. 4.11), где H_2CO_3 выполняет роль донора протонов, а ион HCO_3^- – их акцептора. Система H_2CO_3 – HCO_3^- служит основной буферной системой плазмы крови.

Перенос CO_2 из тканей в легкие состоит из следующих этапов (рис. 24-22). Растворенная CO_2, образующаяся в качестве продукта окисления в цикле лимонной кислоты, а также в других процессах, включающих ферментативное декарбоксилирование, диффундирует из тканей в плазму крови и далее в эритроциты. В эритроцитах CO_2 в ходе обратимой реакции гидратируется с образованием свободной угольной кислоты:

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$$

В отсутствие катализатора эта реакция протекает относительно медленно и образование угольной кислоты отстает от образования CO_2 в дышащих тканях. Од-



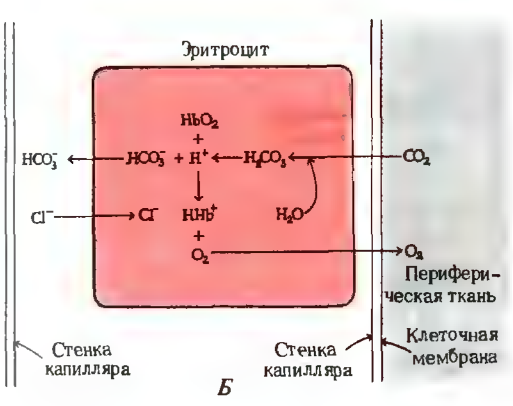


Рис. 24-22. Координированность переноса кислорода и CO_2 эритроцитами. *А*. В легких в результате оксигенации гемоглобина происходит высвобождение ионов H^+, которые далее присоединяются к ионам HCO_3^- с образованием H_2CO_3. Под действием карбоангидразы H_2CO_3 подвергается дегидратации, в результате чего образуется растворенная CO_2, которая диффундирует в плазму крови, а из нее – в воздушное пространство легких и выдыхается. *Б*. Захват эритроцитами растворенной CO_2 в периферических тканях требует участия карбоангидразы, катализирующей гидратирование CO_2 с образованием H_2CO_3; далее H_2CO_3 теряет ион H^+ и превращается в HCO_3^-. Высвобождаемые при этом ионы H^+ смещают равновесие реакции гемоглобина с кислородом в направлении отщепления кислорода и его передачи ткани. Поскольку O_2 и CO_2 растворимы в липидах, они легко проходят через клеточные мембраны, не нуждаясь в системах мембранного транспорта. Однако обмен между ионами Cl^- и HCO_3^-, осуществляемый через мембрану эритроцитов, протекает только при помощи систем, обеспечивающих транспорт анионов.

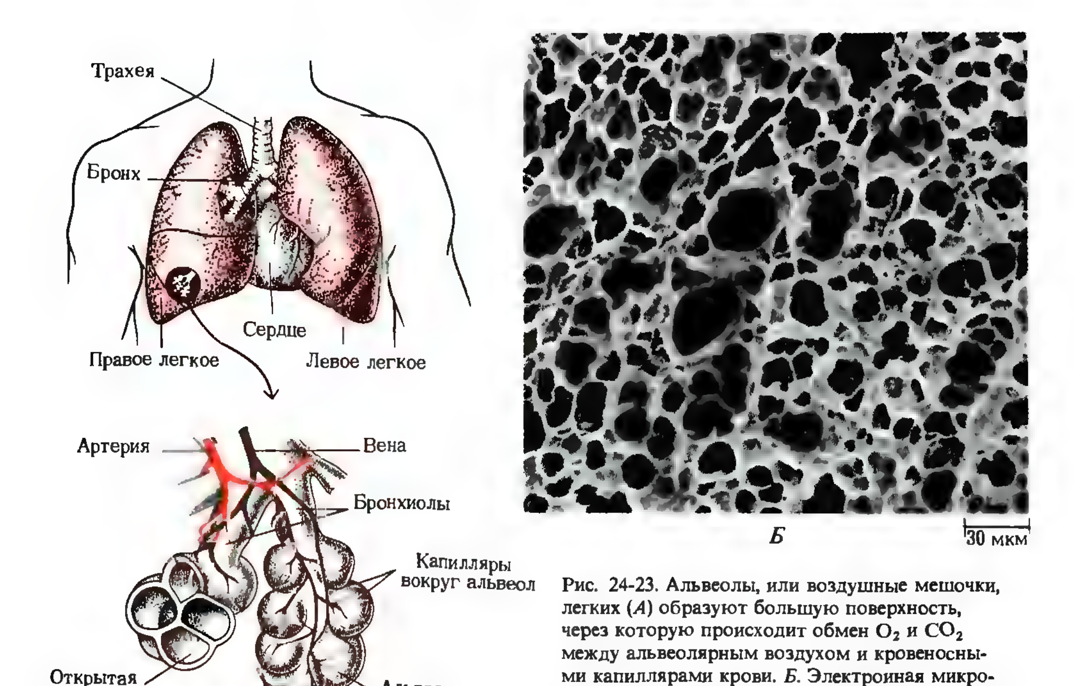


Рис. 24-23. Альвеолы, или воздушные мешочки, легких (*А*) образуют большую поверхность, через которую происходит обмен O_2 и CO_2 между альвеолярным воздухом и кровеносными капиллярами крови. *Б*. Электронная микрофотография, на которой видны альвеолы и кровеносные капилляры.

нако в эритроцитах содержится *карбоангидраза* – исключительно активный фермент, резко ускоряющий эту реакцию. По мере образования H_2CO_3 она сразу же ионизируется, давая ион бикарбоната:

$$H_2CO_3 \rightleftarrows H^+ + HCO_3^-$$

Образованный таким образом ион HCO_3^- выходит из эритроцитов в плазму в обмен на ион хлора (Cl^-). Что касается ионов H^+, появляющихся в эритроцитах при ионизации угольной кислоты (H_2CO_3), то они способствуют отщеплению кислорода от оксигемоглобина в соответствии с упомянутой выше реакцией, но идущей в обратном направлении:

$$H^+ + HbO_2 \rightleftarrows HHb^+ + O_2$$

Таким образом, накопление ионов H^+, обусловленное входом CO_2 в эритроциты и превращением CO_2 в HCO_3^-, облегчает доставку кислорода кровью при прохождении через периферические ткани.

В обогащенной двуокисью углерода венозной крови, возвращающейся в легкие, тот же цикл протекает в обратном направлении. Связывание кислорода гемоглобином в капиллярах легких приводит к высвобождению ионов H^+:

$$HHb^+ + O_2 \rightleftarrows H^+ + HbO_2$$

Накопление H^+ в свою очередь способствует образованию в эритроцитах угольной кислоты из HCO_3^-:

$$H^+ + HCO_3^- \rightleftarrows H_2CO_3$$

Далее угольная кислота подвергается в присутствии карбоангидразы дегидратированию с образованием CO_2 в растворенном виде:

$$H_2CO_3 \rightleftarrows H_2O + CO_2$$

Растворенная CO_2 выходит из эритроцитов в плазму крови, проходит сквозь стенки капилляров и выводится через огромную поверхность легких в воздушное пространство (рис. 24-23). В целом перенос кислорода и перенос CO_2 усиливают друг друга, что обусловлено особенностями гемоглобина, прекрасно приспособленного для выполнения этих специализированных транспортных функций.

24.16. Диагностика и лечение сахарного диабета опираются на данные биохимических анализов

Поскольку биохимический анализ различных компонентов в крови и моче позволяет оценивать особенности метаболизма, его успешно используют как при диагностике заболеваний, вызванных нарушением обмена веществ, так и в ходе их лечения. Наиболее ярким примером служит сахарный диабет – заболевание, обусловленное недостаточностью секреции или эффективности действия инсулина (гормона поджелудочной железы) и приводящее к глубоким нарушениям обмена веществ. В США сахарный диабет в качестве причины смертности занимает третье место. Он довольно широко распространен: почти у 5% населения США выявляется определенная степень нарушения обмена глюкозы, свидетельствующая о наличии диабета или тенденции к его развитию. Сахарный диабет – это по существу группа заболеваний, выражающихся в нарушении регуляторной активности инсулина, которое может быть обусловлено разными причинами. Более того, на обмен глюкозы могут оказывать воздействие и другие гормоны. Возникновение диабета обусловлено в какой-то мере генетическими причинами; не исключено, однако, что помимо этого определенную роль может играть и вирусная инфекция. Существует диабет двух основных типов: *начинающийся в юности* и *начинающийся во взрослом состоянии.* В первом случае болезнь проявляется в раннем возрасте и быстро переходит в тяжелую форму. Во втором случае заболевание развивается медленно, протекает стерто и часто вообще остается незамеченным. Диабет, начинающийся в юности, лечат инъекциями инсулина; при этом на протяжении всей жизни больного необходимо тщательно следить за балансом между потреблением глюкозы и дозой вводимого инсулина. Для диагностики и лечения диабета, который вызывает серьезные нарушения обмена веществ, очень важны биохимические анализы крови и мочи (табл. 24-6).

Таблица 24-6. Основные изменения в составе крови и мочи при некомпенсированном сахарном диабете

Знак ¿ означает увеличение	Знак ¡ означает снижение
Моча	
Глюкоза	¿
Кетоновые тела	¿
pH	¡
Na^+	¿
NH_4^+	¿
Мочевина	¿
Объем	¿
Кровь	
Глюкоза	¿
Кетоновые тела	¿
Мочевина	¿
pH	¡
Общее содержание CO_2 (сумма $CO_2 + HCO_3^-$)	¡

Характерные симптомы диабета – постоянная жажда и частое мочеиспускание (*полиурия*) – сопряжены с потреблением больших объемов воды (*полидипсия*). Эти изменения обусловлены выведением с мочой большого количества глюкозы (*глюкозурией*). Латинское название сахарного диабета – diabetes mellitus – означает «избыточное выделение сладкой мочи». В случаях тяжелого некомпенсированного диабета содержание глюкозы в суточной (за 24 ч) моче может превысить 100 г, тогда как у здоровых людей глюкоза выводится с мочой лишь в следовых количествах. Большой объем мочи у больных диабетом отражает тот факт, что почки вместе с глюкозой должны выводить дополнительное количество воды, поскольку их способность концентрировать растворенные в моче вещества имеет определенный предел. Измерение количества глюкозы в суточной моче используется как один из тестов при диагностике диабета.

Большее значение имеют, однако, определение содержания глюкозы в крови и характер изменения этого показа-

теля после потребления глюкозы. У больных диабетом концентрация глюкозы в крови обычно повышена, т.е. имеет место *гипергликемия*. В очень тяжелых случаях некомпенсированного диабета концентрация глюкозы в крови может быть чрезвычайно высокой – до 100 мМ, т.е. в 25 раз выше нормы. При диабете средней тяжести концентрация глюкозы в крови иногда мало отличается от нормы. Более чувствительным диагностическим тестом в этом случае оказывается *проба с сахарной нагрузкой*, которая состоит в следующем: больной выпивает натощак стакан воды, в которой растворено 100 г глюкозы; измерения концентрации глюкозы в крови проводят до и через 30 мин после приема глюкозы. У здорового человека глюкоза быстро усваивается, и ее концентрация в крови при проведении указанной пробы возрастает не более чем до 9-10 мМ, поскольку увеличение содержания глюкозы в крови стимулирует секрецию инсулина поджелудочной железой, а инсулин в свою очередь увеличивает скорость потребления глюкозы тканями. При этом в норме глюкоза в моче не появляется или почти не появляется (рис. 24-24).

У больных же диабетом уровень глюкозы в крови уже натощак может оказаться высоким, а тест с сахарной нагрузкой свидетельствует о нарушении усвоения глюкозы. Концентрация глюкозы в крови может при этом намного превысить пороговую для почек, равную примерно 10 мМ, и это приведет к появлению глюкозы в моче, причем ее содержание в крови может оставаться повышенным в течение нескольких часов (рис. 24-24). Замедленное возвращение концентрации глюкозы в крови к исходному значению показывает, что нарушена секреция инсулина в ответ на возрастание уровня глюкозы в крови.

Гипергликемия и глюкозурия свидетельствуют еще об одном глубоком метаболическом сдвиге при сахарном диабете, а именно о почти полной остановке превращения избытка глюкозы в жирные кислоты, запасаемые в виде триацилглицеролов. При тяжелом диабете больные теряют вес, даже находясь на высококалорийной диете. Избыток глюкозы у таких больных не запасается в виде жира, а попросту выводится с мочой.

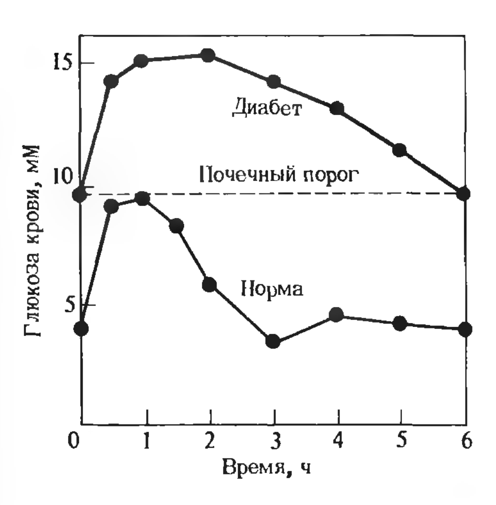


Рис. 24-24. Кривые сахарной нагрузки у здоровых людей и больных диабетом. У здорового человека после потребления стандартного количества глюкозы содержание глюкозы в крови может возрасти вдвое, но оно быстро снижается по мере того, как увеличивается секреция инсулина в ответ на повышение содержания глюкозы в крови. В течение некоторого времени содержание глюкозы в крови остается несколько более низким, чем исходное, что обусловлено лаг-периодом, когда количество инсулина в крови все еще остается повышенным, а содержание глюкозы уже нормализовалось. У больных диабетом содержание глюкозы в крови исходно очень велико (в приведенном случае - почти на уровне почечного порога). У такого больного после потребления стандартного количества глюкозы ее содержание в крови сразу же возрастает, но в отличие от здорового человека из-за недостаточной секреции инсулина оно долго остается повышенным и лишь постепенно возвращается к исходному. При максимальном уровне глюкозы в крови у больного диабетом значительные количества глюкозы выводятся с мочой.

24.17. При диабете возрастает количество кетоновых тел

Еще одно характерное для диабета нарушение метаболизма связано с повышенным, но не завершаемым окислением жирных кислот в печени, вследствие чего в избытке продуцируются кетоновые тела – ацетоацетат и β-гидроксибутират. В результате у больных диабетом эти два соединения накапливаются, поскольку

скорость их использования в периферических тканях отстает от скорости их образования в печени. Кроме ацетоацетата и β-гидроксибутирата в крови больных диабетом содержится также ацетон, появляющийся в результате спонтанного декарбоксилирования ацетоацетата:

$$CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_2{-}COO^- + H_2O \longrightarrow CH_3{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}CH_3 + HCO_3^-$$

Ацетоацетат Ацетон

Ацетон очень летуч; он присутствует в выдыхаемом больным воздухе, придавая ему характерный сладковатый «органический» запах. Из-за этого запаха больного в состоянии диабетической комы иногда ошибочно принимают за пьяного. Избыточное образование кетоновых тел, называемое *кетозом*, приводит к очень большому увеличению их концентрации и в крови (*кетонемия*), и в моче (*кетонурия*).

24.18. При диабете возрастает экскреция мочевины

Для тяжелого диабета характерно также увеличение экскреции мочевины – основного конечного продукта азотистого обмена, образующегося при окислительной деградации аминокислот (разд. 19.14–19.16). Количество мочевины, выделяемой больным в течение суток, служит мерой общего количества аминокислот, распавшихся окислительным путем, что в свою очередь отражает степень сбалансированности между потреблением белков и распадом тканевых белков на протяжении суток. Концентрация мочевины в крови при диабете может достигать 25 мМ, т. е. примерно в 5 раз превышать уровень нормы (около 5 мМ).

Избыточная окислительная деградация аминокислот при диабете обусловлена резким возрастанием скорости глюконеогенеза из аминокислот. Отсутствие инсулина способствует выбросу глюкозы из печени в кровь. В результате запасы гликогена в печени истощаются; в этих условиях все доступные аминокислоты, чей углерод может быть использован для глюконеогенеза, подвергаются деградации и идут на синтез глюкозы, которая поступает в кровь. Отсюда следует, что измерение содержания мочевины в крови и в моче дает ценную информацию относительно состояния обмена веществ у больных диабетом.

24.19. Тяжелый диабет сопровождается ацидозом

У больных, страдающих тяжелой формой диабета и не получающих инсулина, удивительным и очень серьезным по последствиям биохимическим сдвигом является сильное снижение pH крови: этот показатель может упасть до уровня pH 6,8 при норме pH 7,4. Хотя в абсолютных величинах это увеличение кислотности может показаться небольшим, тем не менее оно свидетельствует об очень глубоких изменениях кислотно-основного равновесия в организме. Увеличение кислотности обусловлено поступлением в кровь больших количеств кетоновых тел, интенсивно вырабатывающихся в печени. При окислении одной – нейтральной – молекулы триацилглицерола в печени больного диабетом появляется по крайней мере 12 ионов H^+ в форме β-гидроксимасляной и ацетоуксусной кислот. В ответ на постоянную выработку этих кислот в организме компенсаторно снижается концентрация H_2CO_3 – донора протонов или кислоты в бикарбонатной буферной системе (разд. 4.11). Снижение концентрации H_2CO_3 достигается в результате ускоренного выведения CO_2 в легких (вспомним, что H_2CO_3 обратимо диссоциирует на растворенную CO_2 и H_2O). Именно благодаря выведению CO_2 через легкие соотношение между концентрациями акцептора (HCO_3^-) и донора протонов (H_2CO_3) в бикарбонатном буфере возвращается к исходному, что способствует поддержанию pH на уровне нормы (pH 7,4). Однако при тяжелом диабете для компенсации ацидоза, обусловленного избытком кетоновых тел, легкие должны выделять настолько большие количества CO_2, что суммарная концентрация HCO_3^- и H_2CO_3 становится крайне низкой и буферная емкость крови соответственно

значительно уменьшается. Это приводит к весьма неблагоприятным для организма последствиям.

Возникающие при тяжелом диабете биохимические сдвиги, особенно сдвиг кислотно-основного равновесия, могут угрожать жизни больного. Введение инсулина для коррекции гормональной недостаточности, а также $NaHCO_3$ для повышения буферной емкости крови и компенсации потери ионов Na^+ приводит к почти полной нормализации биохимических процессов уже через 12–24 ч. Для наблюдения за ходом этого лечения необходимо постоянно измерять pH крови и содержание в ней глюкозы и CO_2.

Краткое содержание главы

Крахмал и другие полисахариды частично гидролизуются амилазой слюны в ротовой полости. Переваривание полисахаридов и дисахаридов завершается в тонком кишечнике под действием амилазы поджелудочной железы, а также лактазы, сахаразы и мальтазы, секретируемых эпителиальными клетками кишечника. Белки перевариваются в результате последовательного действия сначала пепсина в кислой среде желудка, а затем трипсина и химотрипсина в тонком кишечнике при pH от 7 до 8. Далее короткие пептиды гидролизуются до аминокислот под действием карбоксипептидазы и аминопептидазы. Триацилглицеролы перевариваются липазой поджелудочной железы, превращаясь в 2-моноацилглицеролы и свободные жирные кислоты, которые эмульгируются при помощи желчных кислот и всасываются. Пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза и липаза секретируются в желудочно-кишечный тракт в виде неактивных зимогенов.

Центром, регулирующим распределение и превращение питательных веществ, служит печень. Глюкозо-6-фосфат – ключевой промежуточный продукт обмена углеводов – может превращаться в печени в гликоген, в глюкозу крови или через ацетил-СоА в жирные кислоты. Он может также подвергаться распаду либо в ходе гликолиза и цикла лимонной кислоты с накоплением энергии ATP, либо в ходе пентозофосфатного цикла с образованием пентоз и NADPH. Аминокислоты либо используются для синтеза белков печени и плазмы, либо превращаются в глюкозу и гликоген в процессе глюконеогенеза. Аммиак, образующийся при дезаминировании аминокислот, включается в состав мочевины в ходе цикла мочевины. Жирные кислоты превращаются в печени в триацилглицеролы, холестерол и липопротеины плазмы; последние обеспечивают транспорт и накопление липидов в жировой ткани. Кроме того, жирные кислоты в печени могут подвергаться окислению, что приводит к запасанию энергии в виде ATP и к образованию кетоновых тел, доставляемых кровью в другие ткани.

Метаболизм скелетных мышц специализирован на выработке ATP, необходимого для их сокращения и расслабления. При интенсивной мышечной нагрузке основным топливом служит гликоген, который превращается в лактат. В период отдыха лактат превращается снова в гликоген печени и глюкозу. Мозг использует в качестве топлива только глюкозу и β-гидроксибутират, причем последний играет важную роль при голодании. Бóльшая часть энергии ATP в мозгу расходуется на активный транспорт ионов Na^+ и K^+ и на поддержание потенциала действия мембран нервных клеток.

Эритроциты участвуют в транспорте как кислорода, так и CO_2 между легкими и периферическими тканями. Захвату кислорода в легких и его высвобождению в тканях способствуют относительно высокое значение pH в легких и более низкое его значение в тканях, а также сигмоидная форма зависимости между парциальным давлением O_2 и процентом насыщения гемоглобина кислородом. Перенос CO_2 эритроцитами сопряжен с транспортом кислорода через компенсаторные сдвиги в содержании ионов H^+ и Cl^-.

Биохимические анализы широко используются при диагностике и наблюдении за ходом лечения многих заболеваний, в частности сахарного диабета; последний сопровождается характерными

для него изменениями содержания глюкозы, мочевины и кетоновых тел в крови, а также pH крови.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Montgomery R., Dryer R. L., Conway T. W., Spector A. A. Biochemistry: A Case-Oriented Approach, 3d ed., Mosby, St. Louis, 1980. Биохимия человека в норме и патологии: изложение опирается на данные отдельных историй болезни.

White A., Handler P., Smith E. L., Hill R. L., Lehman I. R. Principles of Biochemistry, 6th ed., McGraw-Hill, New York, 1978. Приводится много полезных сведений об обмене веществ в отдельных органах, о составе крови и мочи и об их изменениях в норме и патологии.

Статьи

Axelrod J. Neurotransmitters, Sci. Am., **230**, 58–71, June (1974).

Davenport H. W. Why the Stomach Does Not Digest Itself. Sci. Am., **226**, 86–93, January (1972).

Kappas A., Alvares A. P. How the Liver Metabolizes Foreign Substances, Sci. Am., **232**, 22–31, June (1975).

Keynes R. D. Ion Channels in the Nerve-Cell Membrane, Sci. Am., **240**, 126–135, March (1979).

Notkins A. L. The Causes of Diabetes, Sci. Am., **241**, 62–73, November (1979).

Perutz M. F. Hemoglobin Structure and Respiratory Transport, Sci. Am., **239**, 92–125, December (1978).

Вопросы и задачи

1. *Образование желудочного сока.* Желудочный сок (pH 1,5) образуется в результате накачивания протонов из плазмы крови (pH 7,4) в желудок. Рассчитайте количество свободной энергии, необходимое для создания требуемой концентрации ионов H^+ в 1 л желудочного сока. Сколько молей ATP должно быть гидролизовано в клетках для получения такого количества свободной энергии? Напомним, что величина ΔGp гидролиза ATP в существующих в клетке условиях составляет приблизительно −7 ккал/моль.

2. *Нейтрализация желудочного сока.* Оптимум действия ферментов, расщепляющих белки в тонком кишечнике (трипсина, химотрипсина и карбоксипептидазы), лежит в пределах pH от 7 до 8. Однако субстраты этих ферментов поступают из желудка вместе с желудочным соком, имеющим pH 1,5–2,5. Каким образом величина pH желудочного сока доводится до значений, оптимальных для действия ферментов тонкого кишечника?

3. *Перевариваемость казеина и кератина.* β-Казеин (мол. масса 23 600) крупного рогатого скота – один из белков коровьего молока – не содержит остатков цистеина и цистина. Кроме того, четвертичная структура этого белка слабо выражена: его нативная конформация напоминает беспорядочный клубок. В отличие от этого α-кератины (белки, содержащиеся в волосах, шерсти, ногтях и т. д.) очень богаты остатками цистеина и цистина. К тому же эти белки обладают высокоупорядоченной вторичной и третичной структурами. Объясните, каким образом свойства этих двух групп белков отражаются на их перевариваемости. Почему, в частности, молоко, выпиваемое котенком, служит для него прекрасным источником аминокислот, тогда как его собственный мех не переваривается («волосяные пробки» могут даже закупорить кишечник).

4. *Защита главных клеток от переваривания пепсином.* Для того чтобы предшественник пепсина пепсиноген превратился в активный фермент, от его N-конца должен отщепиться фрагмент, содержащий 42 аминокислотных остатка. Процесс активации катализируется обычно самим пепсином, хотя при pH ниже 5 пепсиноген обладает слабой каталитической активностью. Кроме того, отщепляемый при активации фрагмент при pH выше 2 прочно связывается с активным центром пепсина, а при pH ниже 2 – слабо.
   а) Что инициирует активацию пепсиногена в желудке?
   б) Как связаны описанные выше свойства пепсина и пепсиногена с защитой клеток слизистой кишечника от самопереваривания?

5. *Судьба пищеварительных ферментов.* При переваривании богатой белками пищи из поджелудочной железы в желудочно-кишечный тракт выделяется большое количество трипсина, химотрипсина и карбоксипептидазы. Хотя преждевременное высвобождение этих ферментов в активной форме в самой поджелудочной железе может вызвать ее тяжелое повреждение, однако эпителиальные клетки тонкого кишечника не страдают в процессе переваривания богатой белками пищи от действия

указанных ферментов. Более того, при анализе содержимого нижних отделов тонкого кишечника во время пищеварения выявляются только следы этих ферментов, а активный пепсин не обнаруживается вовсе. Попытайтесь объяснить эти факты.

6. *Эффективность карбоксипептидаз.* Выделяемые поджелудочной железой карбоксипептидазы более эффективно гидролизуют белки на завершающих этапах пищеварения, чем на начальных. Объясните, почему.

7. *Непереносимость молока у выходцев с Востока и у негров.* У взрослых негров и у выходцев с Востока в результате употребления в пищу молока часто наблюдаются вздутие живота, спазмы, боли и понос. Эти симптомы возникают через 1–4 ч после потребления всего лишь одного стакана молока (натурального или порошкового). Каким компонентом молока обусловлены эти симптомы? Каким образом этот компонент вызывает появление указанных симптомов?

8. *Причины стеатореи.* Клинические симптомы стеатореи, характеризующейся избытком липидов в кале, обусловлены либо недостаточной секрецией желчных кислот, либо отсутствием секрета поджелудочной железы. Почему эти причины приводят к появлению липидов в кале? Как, исходя из данных анализа кала, можно различить, какая из этих двух причин лежит в основе заболевания? Объясните.

9. *Аланин и глутамин в крови.* В плазме крови содержатся все аминокислоты, необходимые для синтеза белков в организме, но в разных количествах. При этом концентрации двух аминокислот, а именно аланина и глутамина намного выше, чем остальных. Объясните возможные причины высокого содержания этих двух аминокислот.

10. *Действие уабаина на почечную ткань.* Уабаин – токсичный гликозид, избирательно подавляющий активность Na^+, K^+-АТРазы в животных тканях и не влияющий на активность других известных ферментов. Однако по мере добавления уабаина в возрастающих концентрациях к тонким срезам почечной ткани наблюдается нарастающее торможение потребления кислорода вплоть до 66%. Объясните причину этого явления. Какой вывод можно сделать относительно использования энергии дыхания в почечной ткани?

11. *Необходим ли гликолиз для сокращения скелетной мышцы?* Алкилирующий агент иодацетат (ICH_2COO^-) является мощным ингибитором глицеральдегид-3-фосфат – дегидрогеназы, поскольку он связывается с необходимыми для катализа SH-группами. Если полоски скелетной мышцы обработать смесью иодацетата калия и антимицина А (гл. 17), то мышца сохраняет способность к сокращению в ответ на повторную электростимуляцию, но лактат в ней не образуется. Объясните, что́ происходит при этом в мышце. Что служит источником энергии для ее сокращения в этих условиях?

12. *ATP и фосфокреатин как источники энергии в мышцах.* При сокращении скелетной мышцы в ней снижается концентрация фосфокреатина, тогда как концентрация ATP остается практически постоянной. Объясните, как это происходит. Роберт Дэвис в своих классических опытах показал, что после предварительной обработки мышцы фтор-2,4-динитробензолом концентрация ATP в ней быстро падает, тогда как концентрация фосфокреатина остается неизменной на протяжении серии сокращений. Попытайтесь это объяснить.

13. *Метаболизм глутамата в мозгу.* Глутамат, доставляемый кровью в ткань мозга, превращается там в глутамин, который можно обнаружить в оттекающей от мозга крови. Каков смысл этого метаболического превращения? Как оно происходит? В действительности в мозгу вырабатывается больше глутамина, чем может образоваться из доставляемого кровью глутамата. Откуда берется это дополнительное количество глутамина?

14. *Отсутствие глицеролкиназы в жировой ткани.* Глицерол-3-фосфат – ключевой промежуточный продукт в биосинтезе триацилглицеролов. Клетки жировой ткани, специализирующиеся на синтезе и распаде триацилглицеролов, не способны непосредственно использовать глицерол, поскольку в них нет глицеролкиназы, катализирующей реакцию

$$\text{Глицерол} + \text{ATP} \rightarrow \text{Глицерол-3-фосфат} + \text{ADP}$$

Как обеспечивается жировая ткань глицерол-3-фосфатом, необходимым для синтеза триацилглицеролов? Объясните.

15. *Отек, связанный с нефротическим синдромом.* При нефрозе с мочой выделяется большое количество сывороточного альбумина. Содержание альбумина в сыворотке крови таких больных снижается вплоть до 1,0 г на 100 мл, тогда как в норме оно составляет 3,5–4,5 г (табл. 24-3). При этом у больных наблюдаются силь-

ные отеки конечностей, обусловленные накоплением жидкости во внеклеточном пространстве. Объясните происхождение этих симптомов.

16. *Гипергликемия у больных острым панкреатитом.* Для лечения больных острым панкреатитом используют безбелковую диету и внутривенное введение физиологического раствора с глюкозой. Какова биохимическая основа этого лечения? В процессе лечения у этих больных обычно наблюдается гипергликемия. Почему?

17. *Потребление кислорода при физической нагрузке.* Человек в сидячем положении потребляет в течение 10 с около 0,05 л кислорода. Спринтер, соревнуясь в беге на 100 м, за то же время потребляет 1 л кислорода. Пробежав дистанцию, спринтер продолжает тяжело дышать еще несколько минут, потребляя при этом по сравнению со спокойно сидящим человеком дополнительно около 4 л кислорода. Почему потребность в кислороде резко возрастает при беге на короткую дистанцию? Почему повышенная потребность в кислороде сохраняется по окончании бега?

18. *Влияние молочной диеты на pH мочи.* При исключительно молочной диете pH мочи становится ниже (pH < 5), чем при питании обычной смешанной пищей. Вместе с тем известно, что pH цельного молока равен $\sim 7{,}5$. Попытайтесь объяснить этот парадокс, учитывая общий состав молока, где примерно 3,5% приходится на долю лактозы, 3,5% - на жир и около 3,5% - на казеин (фосфопротеин, содержащий много остатков серинфосфата).

19. *Дыхательный ацидоз.* Скорая помощь доставила в местную больницу 22-летнего мужчину с диагнозом отравления наркотиком. При поступлении дыхание больного было поверхностным и нерегулярным. Ввиду ухудшения состояния применили искусственное дыхание с помощью механического респиратора. Анализ артериальной крови показал снижение pH крови до 7,18. Больному ввели внутривенно 12 г бикарбоната натрия.
    а) Почему передозировка наркотика могла привести к дыхательному ацидозу?
    б) Как влияет на pH крови больного механическая вентиляция легких? Как вообще влияет механическая вентиляция легких на способность крови транспортировать кислород в ткани?
    в) Объясните, какова цель введения бикарбоната натрия.

20. *Недостаточность тиамина и функция мозга.* Для больных с тиаминовой недостаточностью характерен целый ряд неврологических симптомов: утрата рефлексов, беспокойство, спутанность сознания. Объясните, почему недостаточность тиамина отражается на функции мозга.

21. *Гиперактивность коры надпочечников и гиперкалиурия.* Гиперактивность коры надпочечников у человека, обусловленная опухолями коры, приводит к избыточной реабсорбции Na^+ в почечных канальцах. При этом у больных выводятся с мочой в повышенном количестве ионы K^+. Почему повышение обратного всасывания ионов Na^+ сопровождается повышенным выведением ионов K^+?

22. *Токсическое действие морской воды.* Почки человека - великолепное устройство, регулирующее удаление ионов Na^+ из крови путем образования мочи, в которой содержание ионов Na^+ достигает 340 мМ. Однако в морской воде концентрация Na^+ вдвое выше той, которую способны создать почки здорового человека. Если человек пьет только морскую воду, то происходит накопление NaCl во внеклеточной жидкости (т.е. в жидкости, окружающей клетки тела), но не во внутриклеточной жидкости. Длительное потребление морской воды приводит к смерти вследствие повреждения клеток мозга. Почему потребление морской воды на протяжении длительного времени вызывает повреждение клеток?

ГЛАВА 25

ГОРМОНЫ

В этой главе мы рассмотрим гормоны и то, как они регулируют взаимодействие между различными органами и тканями.

Слово *гормон* происходит от греческого глагола, означающего «возбуждать», или «раздражать». Гормон – это химический агент, выделяемый в следовых количествах тканью одного типа и доставляемый кровью в другую ткань-мишень, где он вызывает специфическую биохимическую или физиологическую активность. Эндокринология – раздел биомедицинской науки, изучающий гормоны,– относится к числу наиболее интересных областей биохимии. В последнее время здесь на основе полученных результатов раскрыты совершенно новые подходы и перспективы. Более того, поскольку нарушение действия гормонов приводит к заболеваниям, эндокринология стала одной из самых полезных в практическом отношении областей биохимии.

Известно много гормонов, и в настоящее время продолжают выявлять новые. Гормоны регулируют не только обмен веществ, но и многие другие функции организма, рост клеток и тканей, ритм сердца, кровяное давление, работу почек, перистальтику кишечника, выделение пищеварительных ферментов, лактацию и работу репродуктивной системы. Мы не будем здесь рассматривать все эти вопросы. Поскольку биохимические механизмы действия большинства гормонов остаются по существу неизвестными, мы остановимся лишь на биохимии гормонов, регулирующих основные пути метаболизма, а именно адреналина, инсулина, глюкагона, тироксина и гормонов коры надпочечников.

25.1. Гормоны функционируют в рамках сложно перекрещивающейся иерархической системы

Рассмотрим сначала основные эндокринные системы организма и некоторые из их функциональных взаимосвязей. На рис. 25-1 показано анатомическое расположение основных эндокринных желез, играющих важную роль в регуляции метаболизма. Слово «эндокринные» («секретирующие внутрь») означает, что это

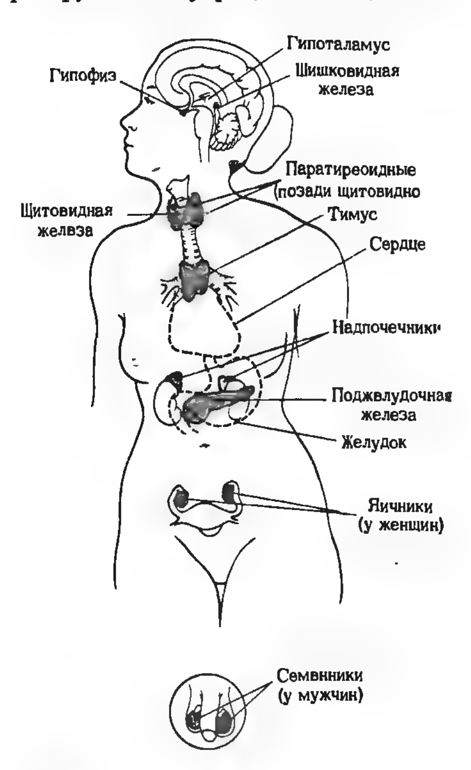


Рис. 25-1. Основные эндокринные железы.

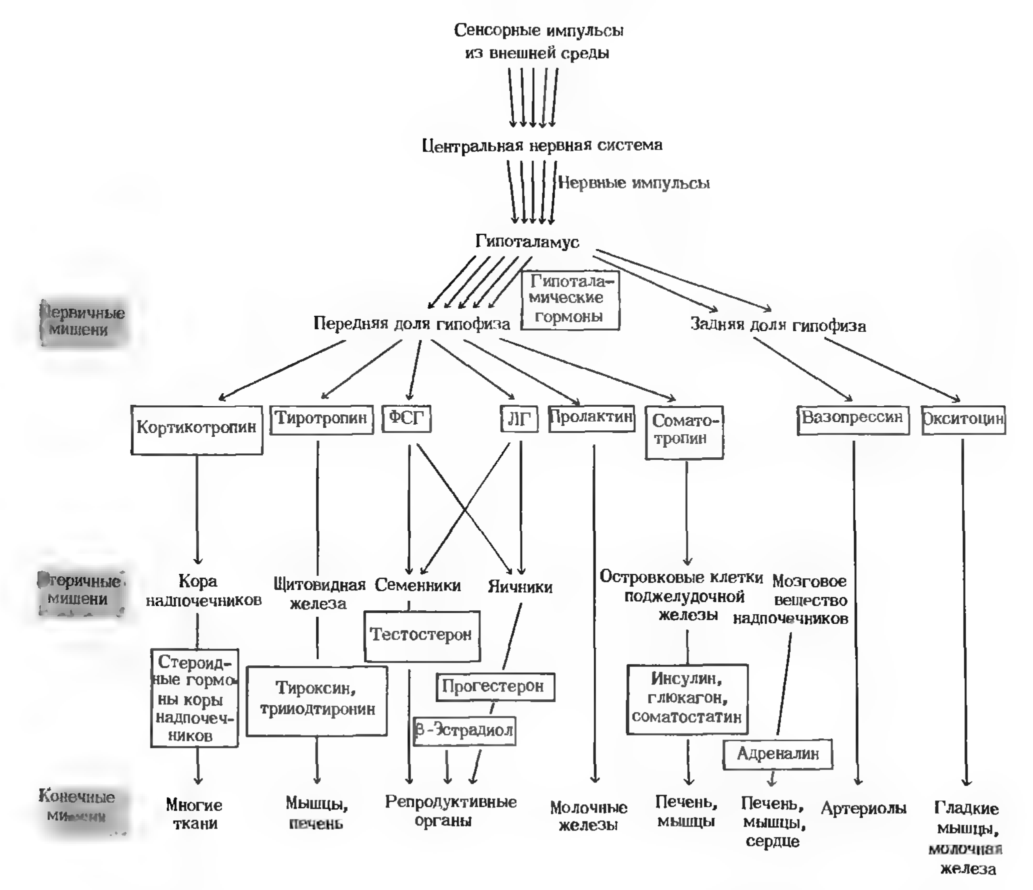


Рис. 25-2. Основные эндокринные системы и их ткани-мишени. Возникающие в нервной системе сигналы, прежде чем достигнуть ткани-мишени, пропускаются через серию переключателей (реле). Кроме показанных на рисунке систем гормоны выделяются тимусом и шишковидной железой, а также группами клеток в желудочно-кишечном тракте. ФСГ фолликулостимулирующий гормон, ЛГ – лютеинизирующий гормон.

железы внутренней секреции, т.е. они выделяют секрет в кровь. Помимо широко известных эндокринных желез, таких, как щитовидная железа или гипофиз, существует много других тканей, например шишковидная железа, тимус или многочисленные группы клеток желудочно-кишечного тракта, которые секретируют различные гормоны.

На рис. 25-2 приведена общая схема регуляторных взаимосвязей между эндокринными железами и их *органами-мишенями*. Координирующим центром эндокринной системы является специализированная область мозга – *гипоталамус*, который получает и интегрирует сигналы, идущие из центральной нервной системы. В ответ на эти сигналы гипоталамус выделяет ряд *гипоталамических регуляторных* гормонов, которые поступают в переднюю долю гипофиза, расположенного непосредственно под гипоталамусом. Каждый гипоталамический гормон регулирует секрецию какого-то одного гормона передней доли гипофиза. Некоторые гипоталамические гормоны стимулируют секрецию данного гормона гипофизом, другие – тормозят. В случае стимуляции секреции гормоны гипофиза выделяются в кровь и достигают эндокринных желез следующего ранга, а именно *коры надпочечников*, эндокринных клеток *поджелудочной железы*, щитовидной железы и яичников или семенников. В результате эти железы

в свою очередь начинают выделять собственные специфические гормоны; последние с током крови попадают на *рецепторы гормонов*, расположенные на поверхности или внутри клеток тех тканей, которые являются конечными мишенями. В этой системе переключателей (реле) есть еще одно звено, а именно клетки тканей-мишеней содержат молекулярный сигнальный агент – *внутриклеточный передатчик* (посредник), передающий сигнал от рецептора гормона на специфическую внутриклеточную структуру или фермент, которые собственно и служат конечной мишенью действия

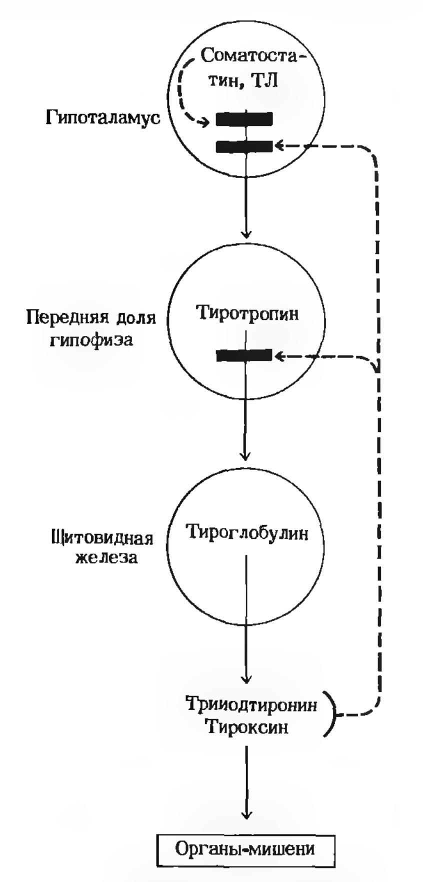


Рис. 25-3. Регуляция секреции тиреоидных гормонов – тироксина и трииодтиронина – по принципу обратной связи. При увеличении концентрации этих гормонов в крови происходит торможение секреции тиролиберина (ТЛ) гипоталамусом и тиротропина гипофизом. Секрецию ТЛ тормозит также другой гипоталамический гормон – соматостатин.

гормона. Таким образом, каждая эндокринная система представляет собой по существу набор реле, через которые сигнал от центральной нервной системы передается к специфической молекуле-эффектору в клетках-мишенях.

Функциональная активность эндокринной системы регулируется также с помощью механизмов, работающих по принципу обратной связи. На рис. 25-3 приведен пример, показывающий, как могут действовать механизмы такого типа. Гипоталамус посылает в переднюю долю гипофиза тиролиберин (ТЛ), стимулируя этим секрецию тиротропина; в свою очередь тиротропин стимулирует выделение щитовидной железой гормонов *тироксина* и *трииодтиронина*, которые попадают далее в ткани-мишени. Однако циркулирующие в крови тиреоидные гормоны тормозят по принципу обратной связи выделение ТЛ гипоталамусом и тиротропина гипофизом. Кроме того, секрекция ТЛ ингибируется *соматостатином*, выделяемым гипоталамусом (а также поджелудочной железой). Этот пример показывает, что выделение или действие какого-то одного гормона может либо находиться под сильным влиянием, либо регулироваться другими гормонами. Таким образом, функциональная активность различных эндокринных систем зависит от очень сложной сети регуляторных взаимосвязей.

25.2. Некоторые общие свойства гормонов

В отношении структуры и функции гормонов можно сделать некоторые обобщения.

а. Существуют три класса гормонов: пептидные, стероидные и амины

К числу *пептидных гормонов* (табл. 25-1), которые могут содержать от 3 до 200 аминокислотных остатков, относятся все гормоны гипоталамуса и гипофиза, а также инсулин и глюкагон, секретируемые поджелудочной железой.

Таблица 25-1. Основные классы гормонов и их представители

	Место секреции
Пептидные гормоны	
Тиролиберин	Гипоталамус
Кортикотропин	Передняя доля гипофиза
Вазопрессин	Задняя доля гипофиза
Инсулин	Поджелудочная железа
Глюкагон	« «
Амины	
Адреналин	Мозговой слой надпочечников
Тироксин	Щитовидная железа
Стероидные гормоны	
Кортизол	Кора надпочечников
β-Эстрадиол	Яичники
Тестостерон	Семенники
Прогестерон	Желтое тело

Гормоны, принадлежащие к классу аминов, представляют собой низкомолекулярные водорастворимые соединения, содержащие в своем составе аминогруппы; к их числу относятся адреналин, секретируемый мозговым слоем надпочечников, и тиреоидные гормоны. К *стероидным гормонам* (которые хорошо растворимы в жирах) относятся гормоны коры надпочечников, *андрогены* (мужские половые гормоны) и *эстрогены* (женские половые гормоны).

б. Некоторые полипептидные гормоны образуются из неактивных предшественников

Некоторые полипептидные гормоны, в том числе инсулин и глюкагон, синтезируются в клетках эндокринных желез сначала в виде неактивных предшественников, или *прогормонов.* Такие неактивные предшественники имеют более длинные полипептидные цепи, чем соответствующие активные гормоны. Примером может служить проинсулин (полипептидная цепь которого содержит приблизительно 80 аминокислотных остатков), превращающийся в активный инсулин (содержащий 51 аминокислотный остаток) путем ферментативного отщепления части полипептидной цепи. Прогормоны накапливаются в неактивной форме в эндокринной клетке, обычно в ее секреторных гранулах. По получении клеткой соответствующего сигнала прогормон способен быстро ферментативным путем превратиться в активный гормон.

в. Гормоны действуют в очень низких концентрациях и в большинстве случаев имеют короткое время жизни

Базальный (нестимулированный) уровень гормонов в крови очень низок; он расположен в пределах от микромолярных (10^{-6} М) до пикомолярных (10^{-12} М) концентраций. В этом отношении гормоны резко отличаются, например, от глюкозы, содержащейся в крови в миллимолярных концентрациях (приблизительно $4 \cdot 10^{-3}$ М). В силу низкой концентрации гормонов их очень трудно выделить, идентифицировать и точно количественно определить. Исключительно высокая чувствительность описанного ниже метода радиоиммунологического анализа открыла совершенно новые возможности исследований в области биохимии гормонов. Этот метод позволяет количественно измерять содержание многих гормонов в ничтожных концентрациях.

При стимуляции секреции какого-либо гормона его концентрация в крови возрастает иногда на несколько порядков. После прекращения секреции концентрация этого гормона быстро возвращается к исходной. Время жизни гормонов в крови очень невелико, часто оно не превышает нескольких минут. Как только отпадает необходимость в присутствии гормона, он быстро инактивируется под действием ферментов.

г. Одни гормоны действуют быстро, другие – медленно

Некоторые гормоны вызывают немедленный биохимический или физиологиче-

ский ответ. Например, печень начинает выбрасывать глюкозу в кровь уже через несколько секунд после выделения адреналина в кровоток. В случае же тиреоидных гормонов или эстрогенов реакция тканей-мишеней на эти гормоны достигает максимума в течение нескольких часов или даже дней. Как мы увидим ниже, эти различия во времени, необходимом для ответа, соответствуют различиям в механизмах действия гормонов.

д. Гормоны связываются со специфическими рецепторами, расположенными либо на поверхности, либо внутри клетки-мишени

Первый этап действия любого гормона – это связывание с какой-то одной специфической молекулой или группой молекул, называемой *рецептором гормона*, которая обычно локализована либо на поверхности клетки-мишени, либо в цитозоле. Рецептор обладает очень высокой специфичностью и сродством по отношению к соответствующему гормону. Рецепторы *водорастворимых* пептидных и аминных гормонов, не способных быстро проходить через клеточную мембрану, располагаются на наружной поверхности клеток-мишеней, тогда как специфические белки, которые являются рецепторами *жирорастворимых* стероидных гормонов, легко проникающих сквозь мембрану, локализованы в цитозоле клеток-мишеней.

е. Действие гормонов может осуществляться через внутриклеточные вторичные передатчики (посредники)

Как только молекула гормона присоединится к рецептору, расположенному на поверхности или внутри клетки-мишени, рецептор претерпевает характерные изменения, которые приводят к образованию или высвобождению в клетке медиатора, называемого обычно *вторичным передатчиком*, или *посредником*. Этот посредник передает сигнал от рецептора гормона на соответствующий фермент или на молекулярную систему внутри клетки, которые, собственно, и выполняют приказ, доставленный гормоном. Внутриклеточный посредник либо регулирует скорость определенной ферментативной реакции, либо включает экспрессию гена (или группы генов), находящегося в неактивном состоянии.

25.3. Гормоны гипоталамуса и гипофиза являются пептидами

Гормоны, секретируемые гипоталамусом (табл. 25-2),–это сравнительно короткие пептиды, содержащие от 3 до 15 аминокислотных остатков. На рис. 25-4 приведены структурные формулы двух таких гормонов. Для их выделения и идентификации потребовались годы трудоемких исследований. По сравнению с другими гормонами гипоталамические факторы выделяются в наименьших количествах. Так, для получения всего лишь 1 мг *тиролиберина* потребовалось 4 т ткани гипоталамуса, которую извлекали из мозга животных на бойнях. Первыми выделили гипоталамические гормоны в чистом виде и выяснили их химическую структуру Роджер Гиллемин из Сан-Диего и Эндрю Шелли из Нью-Орлеана. В 1977 г. они получили за это Нобелевскую премию. Они разделили награду с Розалиндой Ялоу, разработавшей чрезвычайно чувствительный радиоиммунологический метод (дополнение 25-1)

Таблица 25-2. Некоторые гормоны гипоталамуса

Кортиколиберин (высвобождает адренокортикотропин)
Тиролиберин (высвобождает тиротропин)
Соматолиберин (высвобождает соматотропин)
Соматостатин
Пролактолиберин (высвобождает пролактин)
Пролактин-ингибирующий гормон (тормозит выделение пролактина)
Люлиберин (высвобождает лютеинизирующий гормон)
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)

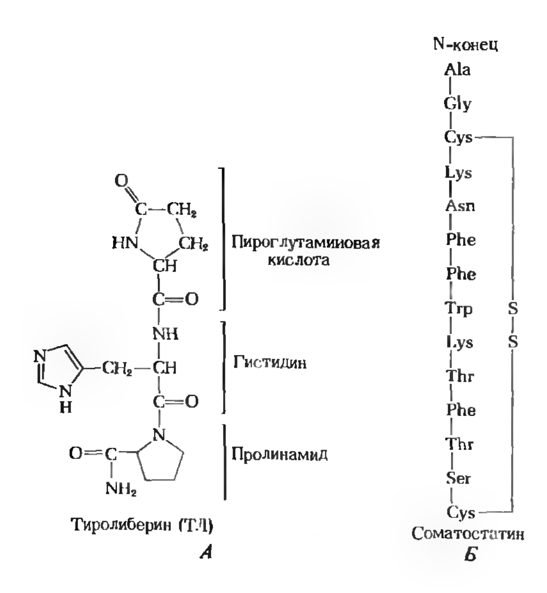


Рис. 25-4. Формулы двух гормонов, секретируемых гипоталамусом. *А*. Тиролиберин (ТЛ) вызывает выделение тиротропина из передней доли гипофиза. Тиротропин в свою очередь стимулирует секрецию тироксина и трииодтиронина щитовидной железой. *Б*. Соматостатин овцы, тормозящий выделение соматотропина передней долей гипофиза.

определения концентрации гормонов, без которого был бы немыслим достигнутый в последние годы прогресс в исследовании гормонов.

Гипоталамические гормоны не поступают в общий кровоток, а по специальным кровеносным сосудам попадают прямо в расположенный рядом

Дополнение 25-1. Радиоиммунологический анализ полипептидных гормонов

В ответ на попадание в организм чужеродных белков (антигенов) у животных синтезируются специфические к ним антитела. Белок-антитело, появляющийся в сыворотке крови, обладает способностью очень прочно, но обратимо связываться с молекулой антигена. Каждое антитело характеризуется высокой степенью специфичности и связывает только тот антиген, который стимулировал его выработку. Эти свойства антител, а именно их специфичность и сродство по отношению к своим антигенам были использованы Розалиндой Ялоу и ее коллегами для измерения крайне малых концентраций полипептидных гормонов в крови и тканях. Суть метода состоит в следующем. Измеряемый гормон используют в качестве антигена (Аг) и вводят его морским свинкам. После нескольких инъекций у животных в плазме крови появляются антитела к введенному гормону, причем в достаточно высокой концентрации. Далее из сыворотки выделяют антитела (Ат) и смешивают их с известным количеством радиоактивно меченного гормона ($\overset{*}{\text{Аг}}$); при этом в результате обратимой реакции, равновесие которой сильно сдвинуто вправо, образуется комплекс антиген–антитело:

$$\overset{*}{\text{Аг}} + \text{Ат} \rightleftarrows \overset{*}{\text{Аг}} - \text{Ат}$$

Для того чтобы определить концентрацию гормона в крови больного, смешивают сыворотку крови с известным количеством радиоактив-

ного комплекса $\overset{*}{\text{Аг}}$–Ат. Поскольку антитело (Ат) не способно отличить уже связанный радиоактивный гормон ($\overset{*}{\text{Аг}}$) от присутствующего в сыворотке немеченого гормона (Аг), последний будет конкурировать с меченым ($\overset{*}{\text{Аг}}$) за связывание с антителом Ат и частично вытеснять его из комплекса $\overset{*}{\text{Аг}}$–Ат:

$$\text{Аг} + \overset{*}{\text{Аг}}\text{–Ат} \rightleftarrows \overset{*}{\text{Аг}} + \text{Аг–Ат}$$

По достижении равновесия между антителом и меченым и немеченым гормонами измеряют количество радиоактивного антигена, вытесненного немеченым гормоном из комплекса $\overset{*}{\text{Аг}}$–Ат, и исходя из этого рассчитывают концентрацию гормона во взятом образце крови. Например, если количество гормона в анализируемом образце в точности равно количеству радиоактивного гормона, уже связанного с антителом, то это значит, что немеченый гормон вытеснил ровно половину меченого. Чем выше концентрация немеченого гормона в анализируемой пробе, тем больше радиоактивного гормона вытесняется из комплекса $\overset{*}{\text{Аг}}$–Ат.

Радиоиммунологический анализ отличается не только высокой специфичностью, но и исключительно высокой чувствительностью. В своей речи, произнесенной по случаю присуждения Нобелевской премии, для наглядной характеристики чрезвычайно высокой чувствительности радиоиммунологического метода Ялоу сравнила концентрацию определяемого этим методом гормона в анализируемом растворе с концентрацией сахара в очень большом озере после растворения в нем одного кусочка.

гипофиз (рис. 25-5). Гипофиз состоит из двух частей – *передней и задней долей*, имеющих разное эмбриональное происхождение. В передней доле продуцируется несколько гормонов, представляющих собой довольно длинные полипептиды (табл. 25-3). Их называют *тропными гормонами*, или *тропинами*, поскольку они обладают сродством к эндокринным железам следующего ранга и оказывают на них стимулирующее действие. Так, кортикотропин стимулирует кору надпочечников, а тиротропин – щитовидную железу. Основные гормоны передней доли гипофиза получены в чистом виде, и установлена их аминокислотная последовательность. Некоторые гормоны гипофиза, в частности кортикотропин, используются в медицине с целью восполнения дефицита гормона при нарушении его секреции.

Задней долей гипофиза секретируются два гормона – *окситоцин* и *вазопрессин*. Они представляют собой пептиды из девяти аминокислотных остатков, образующиеся из более длинных предшественников (рис. 25-6). Секреция этих гормонов регулируется гипоталамусом.

Таблица 25-3. Гормоны гипофиза

	Мол. масса
Гормоны передней доли гипофиза	
Кортикотропин	4 500
Тиротропин	28 000
Соматотропин	21 500
Фолликулостимулирующий гормон	34 000
Лютеинизирующий гормон	28 500
Пролактин	23 500
Липотропин	11 800
Гормоны задней доли гипофиза	
Вазопрессин	1 070
Окситоцин	1 070

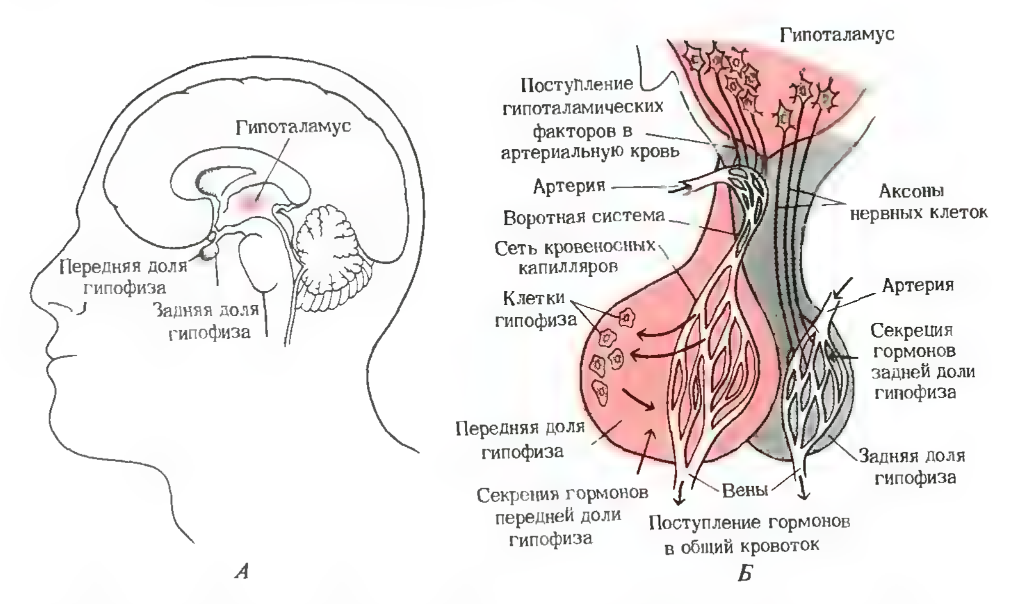


Рис. 25-5. *А*. Локализация гипоталамуса и гипофиза. *Б*. Подробная схема гипоталамо-гипофизарной системы. Нервные импульсы стимулируют гипоталамус, активируя секрецию гормонов, предназначенных для воздействия на переднюю долю гипофиза; эти гормоны попадают в специальный кровеносный сосуд, по которому они поступают непосредственно в капиллярную сеть передней доли гипофиза. Гормоны гипофиза, выделенные в ответ на стимуляцию, поступают в кровь и входят в общую систему кровообращения. Гормоны задней доли гипофиза, образующиеся в нервных клетках гипоталамуса, далее по аксонам попадают в заднюю долю гипофиза и из нее – в кровь.

Окситоцин (от греч. «быстрые роды») действует на некоторые гладкие мышцы, в особенности на мышцу матки. Он используется в акушерстве для стимуляции родовой деятельности и лактации. Вазопрессин повышает кровяное давление и увеличивает обратное всасывание воды в почках. Недостаточность вазопрессина лежит в основе несахарного диабета (diabetes insipidus), для которого характерно выделение большого количества сильно разбавленной мочи (до 10 л в сутки). Это состояние следует отличать от сахарного диабета – также эндокринного заболевания. Ниже мы еще вернемся к действию гипоталамических и гипофизарных гормонов.

Здесь же мы рассмотрим гормоны, регулирующие метаболизм основных питательных веществ. Механизм действия этих гормонов изучен лучше, чем механизм действия каких-либо других гормонов, и они получили широкое применение при лечение ряда эндокринных заболеваний, связанных с нарушениями обмена веществ.



Рис. 25-6. Гормоны задней доли гипофиза. С-концевые аминокислотные остатки (—Gly—NH_2), показанные красным цветом, – это остатки глицинамида (—NH—CH_2—CO—NH_2).

25.4. Мозговой слой надпочечников секретирует гормоны класса аминов – адреналин и норадреналин

Из всех гормонов наиболее полно изучен *адреналин*. Его хорошо известный механизм действия используется в качестве модели при исследовании других гормонов. Органы-мишени адреналина – печень и скелетные мышцы, а также сердце и сердечно-сосудистая система.

Адреналин (другое название – эпинефрин) и *норадреналин* (норэпинефрин) – очень близкие по структуре гормоны. Они образуются в *мозговом* (внутреннем) слое надпочечников, расположенных непосредственно над почками (рис. 25-1).

Тирозин, исходное соединение

Норадреналин

3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА)

Адреналин

Дофамин

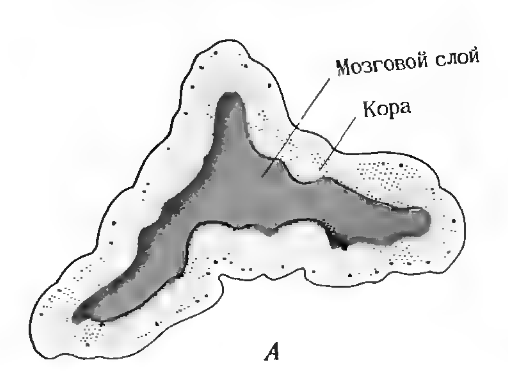
Катехол

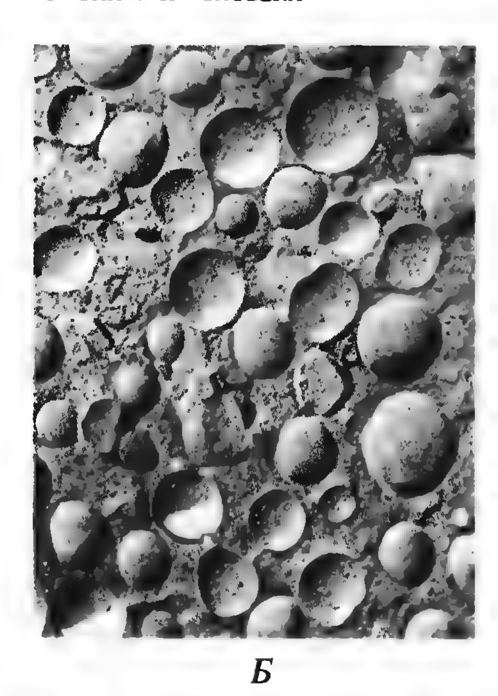
Рис. 25.7. Катехоламины. Эти гормоны образуются из аминокислоты тирозина и представляют собой производные катехола, или 1,2-дигидроксибензола, формула которого приведена внизу справа.

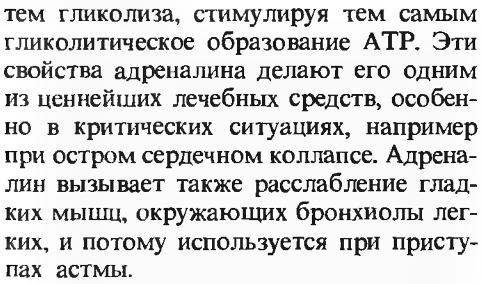
Мозговой слой надпочечников является по существу частью нервной системы и регулируется ею. Адреналин и норадреналин – это водорастворимые амины, образующиеся из тирозина через 3,4-дигидроксифенилаланин (дофа), как показано на рис. 25-7. Еще один промежуточный продукт этого пути превращения тирозина – *3,4-дигидроксифенилэтиламин*, известный под названием дофамина, – обладает гормональными свойствами. Адреналин, норадреналин и дофамин называют *катехоламинами*, поскольку их можно рассматривать как производные катехола, или 1,2-дигидроксибензола (рис. 25-7). Катехоламины образуются также в мозгу и нервной системе, где они функционируют в качестве нейромедиаторов. При болезни Паркинсона нарушается образование дофамина в мозгу, ее симптомы снимаются при введении предшественника дофамина – дофа.

Адреналин накапливается в клетках мозгового слоя надпочечников в особых хромаффиновых гранулах. Последние представляют собой ограниченные мембраной структуры диаметром около 0,1 мкм (рис. 25-8), содержащие адреналин (около 20%) и ATP (около 4%). Под действием нервных импульсов, достигающих мозгового слоя надпочечников, из этих гранул путем экзоцитоза выделяется адреналин, который попадает в окружающую внеклеточную среду и далее в кровь. Обычная концентрация адреналина в крови составляет около 0,06 мкг/л, или приблизительно 10^{-10} М, но под влиянием сенсорных воздействий, вызывающих у животного состояние тревоги и готовности к борьбе или бегству, концентрация адреналина в крови возрастает за время, исчисляемое секундами или минутами, почти в 1000 раз. Адреналин приводит животное в состояние готовности к борьбе или к бегству разными путями. Он ускоряет ритм сердца, увеличивает сердечный выброс и повышает кровяное давление, подготавливая тем самым сердечно-сосудистую систему к активности в экстремальной ситуации. Адреналин стимулирует расщепление гликогена печени и увеличивает содержание глюкозы в крови, обеспечивая мышцы топливом, необходимым для работы в анаэробных условиях; и, наконец, он способствует анаэробному распаду гликогена до молочной кислоты в скелетных мышцах пу-

Рис. 25-8. *А*. Схематическое изображение надпочечника в разрезе. Мозговой слой секретирует адреналин и норадреналин, корковый – стероидные гормоны коры надпочечников. *Б*. Полученная методом замораживания скалывания реплика хромаффиновых гранул в цитоплазме клеток мозгового слоя надпочечников крысы. В этих гранулах содержатся в больших количествах адреналин и АТР. Под влиянием поступившего нервного сигнала происходит выделение содержимого гранул путем экзоцитоза.







тем гликолиза, стимулируя тем самым гликолитическое образование АТР. Эти свойства адреналина делают его одним из ценнейших лечебных средств, особенно в критических ситуациях, например при остром сердечном коллапсе. Адреналин вызывает также расслабление гладких мышц, окружающих бронхиолы легких, и потому используется при приступах астмы.

Благодаря классическим исследованиям американского биохимика Эрла Сэзерленда и его сотрудников в настоящее время мы имеем довольно полное представление о биохимическом механизме стимуляции распада гликогена адреналином.

25.5. Адреналин стимулирует образование циклического аденозинмонофосфата

В начале 50-х годов Сэзерленд обнаружил, что добавление адреналина к интактным срезам печени, суспендированным в буферной среде, увеличивает скорость распада гликогена и способствует высвобождению свободной глюкозы в среду. Когда он подверг экстракции обработанную адреналином печеночную ткань и измерил активность ферментов, участвующих в распаде гликогена до глюкозы, оказалось, что активность *гликоген-фосфорилазы* в этом экстракте резко возросла по сравнению с экстрактом интактных срезов печени. Исходя из этих данных, Сэзерленд заключил, что скорость гликогенолиза лимитируется активностью гликоген-фосфорилазы, катализирующей процесс расщепления гликогена до глюкозо-1-фосфата, и что активность этого фермента возрастает при воздействии адреналина на ткань печени. Однако, когда он добавил адреналин к препарату очищенной гликоген-фосфорилазы, никакого повышения активности фермента обнаружить не удалось. Отсюда следовало, что стимулирующий эффект адреналина на фосфорилазу был не прямым, а зависел от каких-то факторов, присутствующих в интактных печеночных клетках.

Вместе с тем активность гликоген-фосфорилазы в гомогенате значительно возрастала при добавлении адреналина к гомогенату ткани печени в присутствии АТР и ионов Mg^{2+}. Было показано, что этот эффект реализуется в две стадии. На

первой стадии, требующей присутствия ATP и ионов Mg^{2+}, адреналин, воздействуя на мембранную фракцию гомогената печени, вызывает образование в ней растворимого термостабильного стимулирующего фактора. На второй стадии, также требующей участия ATP, под действием термостабильного фактора, образующегося на первой стадии, неактивная форма фосфорилазы – фосфорилаза *b* (разд. 15.12), локализованная в растворимой части гомогената печени, превращается в активную форму – фосфорилазу *a*. Этот фактор, стимулирующий активацию фосфорилазы и в нормальных условиях присутствующий в клетках в ничтожных количествах, был в конце концов выделен в кристаллическом виде. Анализ показал, что он содержит аденин, рибозу и фосфат в соотношении 1 : 1 : 1. Напрашивалось предположение, что он возникает непосредственно из того ATP, присутствие которого необходимо для его образования. В 1960 г. было установлено, что этот фактор является не чем иным, как *3′,5′-циклической адениловой* (*аденозинмонофосфорной*) *кислотой*, т.е. производным адениловой кислоты, которое до тех пор никогда не обнаруживалось в биологическом материале. В циклическом аденозинмонофосфате единственная фосфатная группа образует эфирные связи с двумя гидроксильными группами рибозы, а именно с 3′- и 5′-гидроксилами. Следовательно, это соединение представляет собой циклический фосфодиэфир (рис. 25-9). Было показано, что добавление очень малых количеств циклического аденозинмонофосфата (cAMP) к растворимым экстрактам печени действительно вызывает в присутствии ATP образование фосфорилазы *a* из менее активной фосфорилазы *b*.

Как показали дальнейшие исследования Сэзерленда и сотрудников, адреналин резко стимулирует Mg^{2+}-зависимое превращение ATP во фракции плазматических мембран печеночных клеток. Это превращение состоит в отщеплении неорганического пирофосфата и образовании cAMP:

$$ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} 3',5'\text{-cAMP} + PP_i$$

ATP

Аденилатциклаза

Пирофосфат

3′, 5′-циклический аденозинмонофосфат

Рис. 25-9. Ферментативное образование 3′,5′-циклического аденозинмонофосфата (cAMP) из ATP. Отщепление пирофосфата от ATP приводит к замыканию шестичленного кольца, включающего α-фосфатную группу. В итоге фосфатная группа образует сложноэфирные связи с 3′- и 5′-гидроксильными группами рибозы.

Фермент, катализирующий эту реакцию, – *аденилатциклаза* – был обнаружен затем во многих животных тканях. Он прочно связан с внутренней поверхностью плазматической мембраны и поэтому с трудом поддается экстракции и переходу в растворенную форму. Итак, связывание адреналина (*первичного передатчика*) с рецепторными участками на поверхности клетки способствует образованию в клетке cAMP (вторичного передатчика сигнала), который в свою очередь способствует активации гликоген-фосфорилазы.

25.6. cAMP стимулирует активность протеинкиназы

Каким образом cAMP стимулирует превращение неактивной фосфорилазы *b* в активную фосфорилазу *a*? Напомним (разд. 20.14), что это превращение происходит под действием киназы фосфорилазы, катализирующей перенос терминальных фосфатных групп от двух молекул ATP на гидроксильные группы двух специфических остатков серина в фосфорилазе *b*, что и приводит к образованию фосфорилазы *a*:

$$2ATP + \text{Фосфорилаза } b \rightarrow 2ADP + \text{Фосфорилаза } a$$

Циклоаденозинмонофосфат (cAMP) сам по себе не оказывает прямого действия на киназу фосфорилазы. Этот фермент также существует в активной и менее активной формах (разд. 15.12). Неактивная форма киназы фосфорилазы превращается в активную путем фосфорилирования с помощью ATP.

Теперь мы подошли к регуляторной связи между cAMP и активностью гликоген-фосфорилазы. Недостающим звеном остался только фермент, называемый *протеинкиназой*, который также существует в активной и неактивной формах. Активная протеинкиназа катализирует фосфорилирование неактивной киназы фосфорилазы посредством ATP с образованием активной фосфорилированной формы; в этой реакции донором фосфатных групп служит ATP, а ее активатором – ионы Ca^{2+}:

$$\underset{\text{(неактивная форма)}}{\text{Киназа фосфорилазы}} + ATP \xrightarrow{\text{Активная протеинкиназа, } Ca^{2+}} \underset{\text{(активная форма)}}{\text{Ⓟ – киназа фосфорилазы}} + ADP$$

Киназа фосфорилазы – это очень крупный белок с молекулярной массой свыше 1 млн. Она состоит из 16 субъединиц, каждая из которых содержит специфический остаток серина, который под действием активированной протеинкиназы фосфорилируется посредством ATP.

Протеинкиназа, играющая ключевую роль в процессе активации фосфорилазы под влиянием cAMP, является аллостерическим ферментом. В неактивной форме она состоит из двух каталитических субъединиц (C) и двух регуляторных субъединиц (R) (рис. 25-10). Когда все эти субъединицы объединены в общий комплекс, имеющий состав C_2R_2, фермент неактивен. Аллостерическим стимулятором протеинкиназы служит cAMP. При связывании четырех молекул cAMP со специфическими участками двух регуляторных субъединиц C_2R_2-комплекс распадается на свободные каталитические субъединицы, обладающие ферментативной активностью, и комплекс R_2–$cAMP_4$, в котором cAMP сохраняется в связанном виде. Таким образом, cAMP снимает торможение протеинкиназной активности, накладываемое свя-

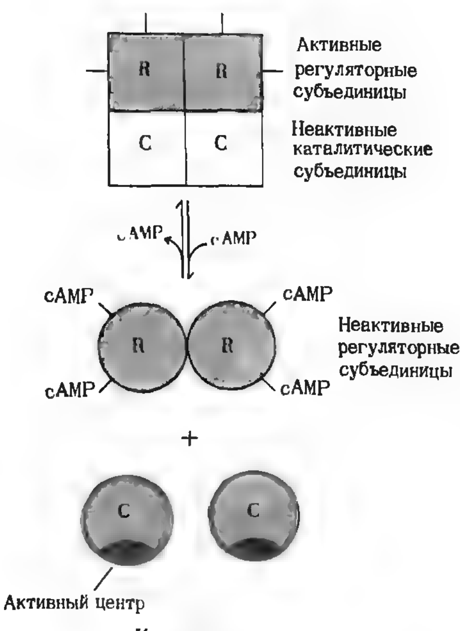


Рис. 25-10. Активация неактивной формы протеинкиназы циклическим аденозинмонофосфатом (cAMP), который связывается с двумя регуляторными субъединицами (R), высвобождая две активные каталитические субъединицы (C) протеинкиназы.

Таблица 25-4. Гормоны, действие которых опосредуется cAMP

Адреналин	Паратиреоидный гормон
Кортикотропин	Тиротропин
Липотропин	Вазопрессин

занной регуляторной субъединицей (рис. 25-10).

Далее оказалось, что cAMP опосредует действие на клетку не только адреналина, но и многих других гормонов (табл. 25-4). Протеинкиназа, активированная cAMP, может фосфорилировать ряд важных ферментов в разнообразных клетках-мишенях.

25.7. Стимуляция распада гликогена в присутствии адреналина происходит посредством каскада усиления

Объединим теперь описанные выше явления и проследим цепь событий, в результате которых адреналин стимулирует в печени распад гликогена до глюкозы, поступающей в кровь (рис. 25-11). Адреналин достигает поверхности клеток печени, где он связывается со специфическим *адренорецептором*. Связывание адреналина (который никогда не входит внутрь клетки) вызывает изменение рецепторного белка. Это изменение каким-то образом передается через мембрану и «включает» аденилатциклазу, связанную с внутренней поверхностью клеточной мембраны. Теперь активированная аденилатциклаза начинает превращать ATP в cAMP – вторичный передатчик, причем концентрация cAMP в цитозоле быстро достигает максимума, равного $\sim 10^{-6}$ M. Образованный cAMP в свою очередь связывается с регуляторными субъединицами протеинкиназы, что приводит к высвобождению ферментативно активных каталитических субъединиц протеинкиназы. Далее активированная протеинкиназа катализирует фосфорилирование посредством ATP неактивной дефосфорилированной формы киназы фосфорилазы с образованием активной фосфорилированной формы фермента. Активная киназа фосфорилазы, для функционирования которой необходимы ионы Ca^{2+}, катализирует далее фосфорилирование относительно неактивной фосфорилазы *b* с помощью ATP, что приводит к образованию активной фосфорилазы *a*. Последняя в свою очередь с большой скоростью расщепляет гликоген с образованием глюкозо-1-фосфата, который превращается далее в глюкозо-6-фосфат и затем в свободную глюкозу, поступающую в кровь (рис. 25-11). Несмотря на большое число стадий в этой последовательности событий, активность гликоген-фосфорилазы успевает достичь пика уже через несколько минут после связывания адреналина клетками печени.

Последовательность стадий, приведенную на рис. 25-11, можно рассматривать как каскад действия одних ферментов на другие. Каждый фермент в этом каскаде активирует множество молекул следующего фермента. Таким путем достигается большое и быстрое усиление поступающего сигнала; по имеющимся оценкам это усиление составляет примерно 25 млн. раз. В итоге связывание всего лишь нескольких молекул адреналина адренорецепторами печени приводит к быстрому выбросу в кровь нескольких граммов глюкозы.

Каскадный процесс, схематически показанный на рис. 25-11, в печени и скелетных мышцах протекает одинаково вплоть до образования глюкозо-6-фосфата. Но в мышцах нет глюкозо-6-фосфатазы, и поэтому в них не образуется свободной глюкозы. Повышение концентрации глюкозо-6-фосфата здесь приводит к значительному увеличению скорости гликолиза с образованием молочной кислоты, в ходе которого вырабатывается ATP, доступный для использования в процессе сокращения. Как показали сравнительно недавние исследования, адреналин стимулирует распад гликогена в печени через еще один каскад усиления, параллельный тому, который показан на рис. 25-11. В этом втором каскадном процессе, который в опреде-

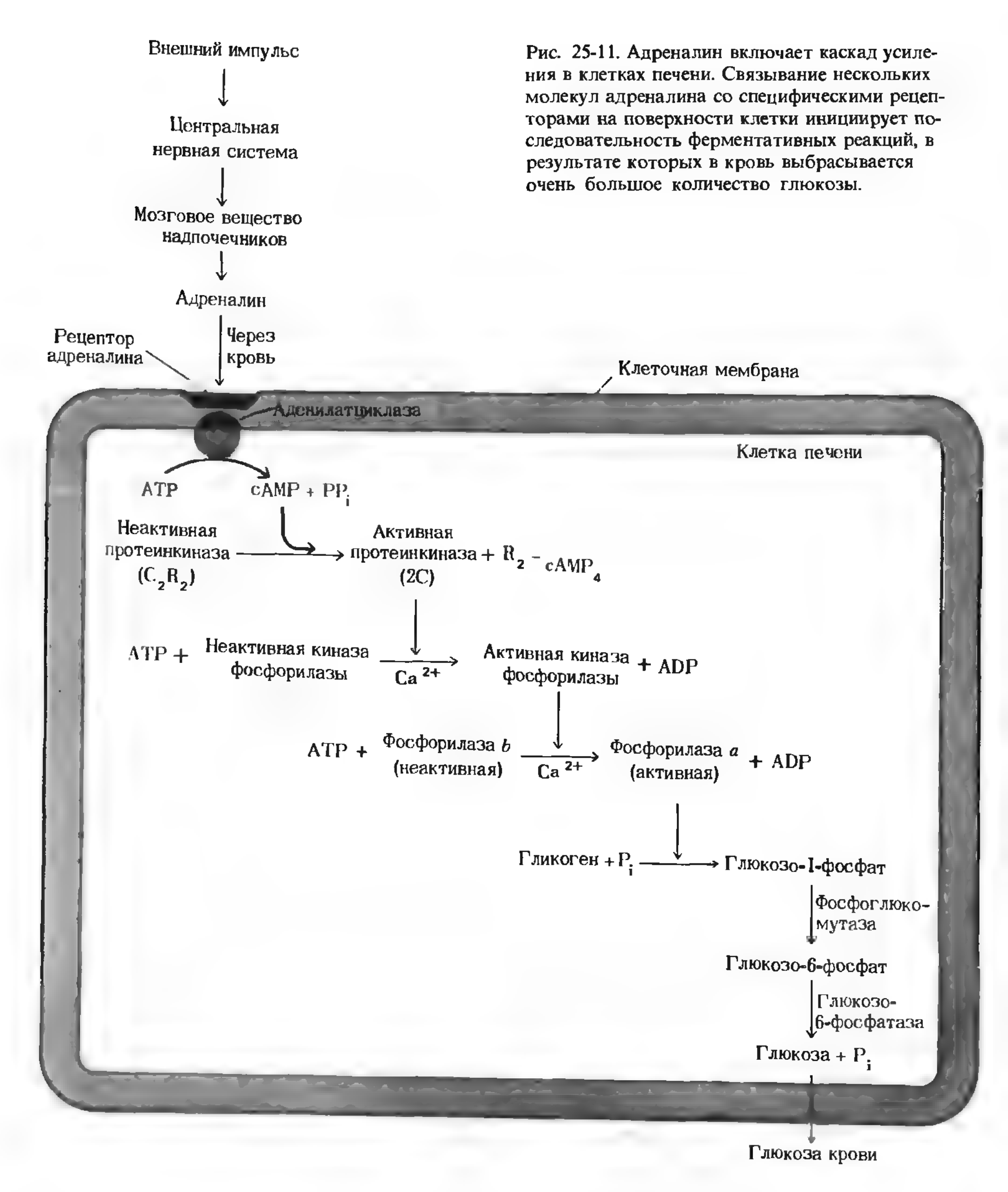


Рис. 25-11. Адреналин включает каскад усиления в клетках печени. Связывание нескольких молекул адреналина со специфическими рецепторами на поверхности клетки инициирует последовательность ферментативных реакций, в результате которых в кровь выбрасывается очень большое количество глюкозы.

ленных условиях оказывается преобладающим. роль вторичного внутриклеточного посредника играют ионы Ca^{2+}.

Показанный на рис. 25-11 каскад запускается в печени не только адреналином, но также, как мы увидим ниже, гормоном поджелудочной железы – глюкагоном.

25.8. Адреналин также тормозит синтез гликогена

Адреналин не только стимулирует распад гликогена, но одновременно тормозит его синтез в печени из глюкозы, что способствует максимальному поступлению глюкозы в кровь. Как видно на рис. 25-12, связывание адреналина на поверхности клеток печени и последующее образование cAMP стимулируют катали-

зируемый протеинкиназой процесс фосфорилирования гликоген-синтазы, в результате которого активная дефосфорилированная форма гликоген-синтазы превращается в неактивную фосфорилированную форму (разд. 20.14). Следовательно, цепь реакций, которая приводит к уменьшению гликоген-синтазной активности, имеет тот же пусковой механизм, что и распад гликогена с образованием свободной глюкозы в крови.

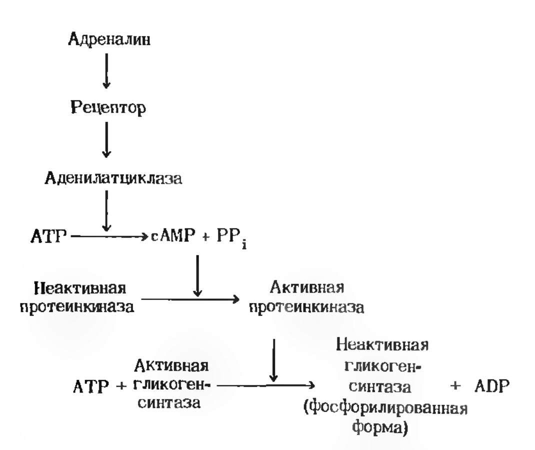


Рис. 25-12. Торможение синтеза гликогена адреналином. Протеинкиназа, активированная циклическим AMP, катализирует фосфорилирование гликоген-синтазы, переводя тем самым фермент в малоактивную форму (см. разд. 20.14).

В итоге весь доступный гликоген, глюкозо-6-фосфат и другие предшественники идут на образование свободной глюкозы, поступающей в кровь; этим достигается максимальное обеспечение мышц топливом и тем самым осуществляется подготовка организма к критической ситуации.

Адреналин действует не только на печень, но и на скелетные мышцы и сердце, где он способствует распаду гликогена также путем стимуляции мышечной фосфорилазы через образование cAMP. Поскольку в мышцах и сердце отсутствует глюкозо-6-фосфатаза, продуктом расщепления гликогена в этих органах является не глюкоза крови, а молочная кислота, образующаяся из глюкозо-6-фосфата в ходе гликолиза. Таким образом, стимуляция распада гликогена в мышцах ведет к увеличению скорости гликолиза и образования ATP, что обеспечивает быстрое возрастание мышечной активности.

25.9. Фосфодиэстераза инактивирует циклический аденозинмонофосфат

До тех пор пока животное чувствует себя в опасности и мозговой слой его надпочечников выбрасывает в кровь адреналин, аденилатциклазная система печени остается полностью активированной. В результате концентрация cAMP в клетках-мишенях поддерживается на относительно высоком уровне, что обеспечивает высокую скорость распада гликогена. Но как только опасность исчезает, секреция адреналина прекращается и его содержание в крови быстро падает в результате ферментативного расщепления в печени. По мере того как рецепторы адреналина становятся незанятыми, аденилатциклаза возвращается в неактивное состояние и образование cAMP прекращается. Оставшийся в клетке cAMP разрушается под действием фосфодиэстеразы (рис. 25-13) – фермента, катализирующего гидролиз 3′-фосфатной связи в cAMP с образованием свободного 5′-аденозинмонофосфата (5′-AMP):

$$3', 5'\text{-cAMP} + H_2O \xrightarrow{\text{Фосфодиэстераза}} 5'\text{-AMP}$$

По мере уменьшения содержания cAMP в цитозоле происходит высвобождение cAMP, связанного с регуляторными субъединицами протеинкиназы. В результате регуляторные субъединицы со-

Циклический 3', 5'-AMP

+ H_2O

Фосфодиэстераза, комплекс кальмодулин – Ca^{2+}

AMP

Рис. 25-13. Действие фосфодиэстеразы на cAMP. Фосфодиэстераза многих тканей активируется ионами Ca^{2+}. Этот эффект непрямой; сначала ионы Ca^{2+} связываются с регуляторным белком кальмодулином, а затем комплекс Ca^{2+}–кальмодулин присоединяется к фосфодиэстеразе, вызывая активацию фермента.

единяются вновь с каталитическими и протеинкиназа переходит в неактивную форму. Фосфорилированная форма киназы фосфорилазы далее подвергается дефосфорилированию так же, как фосфорилаза *a*, под действием фосфатазы фосфорилазы. Все это возвращает систему гликогенолиза в исходное состояние. Одновременно происходит реактивация гликоген-синтазы путем ее дефосфорилирования.

Характерной особенностью фосфодиэстеразы является то, что она ингибируется *кофеином* и *теофиллином* – алкалоидами, содержащимися в небольших количествах в кофе и чае соответственно. Эти алкалоиды пролонгируют или усиливают действие адреналина путем снижения скорости распада cAMP. В ряде тканей фосфодиэстераза активируется ионами Ca^{2+}. Этот эффект обусловлен связыванием ионов Ca^{2+} со специфическим Ca^{2+}-связывающим белком, называемым *кальмодулином*. Комплекс Ca^{2+}–кальмодулин присоединяется к фосфодиэстеразе и активирует ее. Кальмодулин представляет собой недавно открытый Ca^{2+}-связывающий белок, широко распространенный во всем животном мире. Почти у всех видов животных кальмодулин имеет одну и ту же аминокислотную последовательность, т.е. в эволюционном смысле это один из наиболее древних и в высшей степени консервативных животных белков. Концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле регулирует многие функции клетки; в силу этого ионы Ca^{2+}, подобно cAMP, играют важную регуляторную роль как вторичный посредник. Кальмодулин участвует в пере-

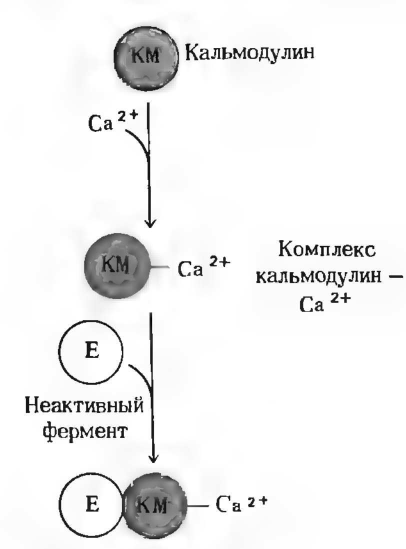


Рис. 25-14. Кальмодулин играет роль медиатора во многих ферментативных реакциях и системах мембранного транспорта, активируемых ионами Ca^{2+}.

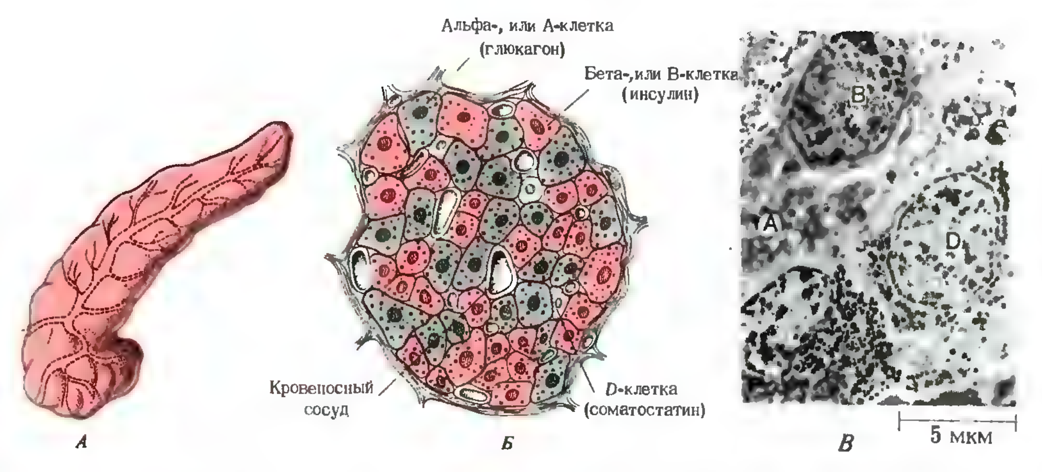


Рис. 25-15. Эндокринная ткань поджелудочной железы. Помимо экзокринных, или ацинарных, клеток, синтезирующих пищеварительные ферменты в форме их зимогенов (гл. 24), в поджелудочной железе имеется эндокринная ткань, называемая островками Лангерганса. Островковая ткань состоит из клеток разных типов, выделяющих специфические полипептидные гормоны. *А*. Общий вид поджелудочной железы. *Б*. Схематическое изображение островка Лангерганса; показаны типы клеток, перечисленные в табл. 25-5. *В*. Электронная микрофотография участка островка Лангерганса из поджелудочной железы человека. Видны А- В- и D-клетки.

даче сигнала, вызывающего увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле, путем образования комплекса Ca^{2+}–кальмодулин; далее этот комплекс связывается со специфическим Ca^{2+}-регулируемым белком, стимулируя его активность (рис. 25-14).

25.10. Поджелудочная железа выделяет ряд гормонов, регулирующих процессы метаболизма

Рассмотрим еще один путь регуляции обмена углеводов, а также аминокислот и липидов, а именно регуляцию гормонами, выделяемыми поджелудочной железой, эндокринная активность которой в свою очередь регулируется гормонами передней доли гипофиза.

Поджелудочная железа имеет две основные биохимические функции. Одна – это биосинтез ряда ферментов, в частности *трипсина, химотрипсина* и *карбоксипептидазы*, которые выделяются в кишечник и участвуют в переваривании пищи. Эту функцию выполняют *экзокринные клетки* («выделяющие наружу», т.е. в проток поджелудочной железы) (рис. 25-15). Другая важная функция поджелудочной железы – это биосинтез инсулина и ряда других полипептидных гормонов, которые регулируют обмен глюкозы и других основных питательных веществ. Эту функцию осуществляет *эндокринная ткань* поджелудочной железы, представляющая собой скопление специализированных клеток, называемых *островками Лангерганса*. Островки содержат близкие друг другу по происхождению клетки нескольких типов, причем клетки каждого типа продуцируют какой-то один гормон поджелудочной железы (рис. 25-15 и табл. 25-5). Островки Лангерганса секретируют следующие гормоны: *глюкагон*, вырабатываемый А-клетками; *инсулин*, вырабатываемый В-клетками; *соматостатин*, вырабатываемый D-клетка-

Таблица 25-5. Гормоны поджелудочной железы

Источник гормона	Гормон
А-клетки	Глюкагон
В-клетки	Инсулин
D-клетки	Соматостатин
F-клетки	Панкреатический полипептид

ми, и *панкреатический полипептид* (сравнительно недавно открытый гормон, для которого еще нет общепринятого названия), вырабатываемый F-клетками. Хотя все эти гормоны каждый по своему важны в обмене веществ, в особенности в обмене углеводов, все же инсулин занимает первое место по важности. Несмотря на исключительное значение инсулина в лечении сахарного диабета, мы до сих пор не знаем в точности, как этот гормон оказывает свое жизненно важное действие. Изучение механизма действия инсулина – одна из наиболее интенсивно исследуемых проблем современной биохимии и медицины.

25.11. Инсулин – гипогликемический гормон

В конце XIX столетия было обнаружено, что у собак после хирургического удаления поджелудочной железы развивается состояние, близкое к сахарному диабету у человека (гл. 24). У этих животных, как и у людей больных диабетом, уровень глюкозы в крови повышен, т.е. имеет место *гипергликемия*. Глюкоза при этом выделяется с мочой в большом количестве, придавая ей сладкий вкус, т.е. имеет место *глюкозурия*. (В свое время сахарный и несахарный диабет различали по вкусу мочи, так как другой признак, а именно выделение больших объемов мочи свойствен обоим состояниям.) Попытки лечить собак с удаленной поджелудочной железой путем скармливания им необработанной ткани поджелудочной железы, полученной от здоровых животных, не привели к успеху, однако инъекция экстрактов нормальной поджелудочной железы прооперированным собакам ослабляла проявление у них симптомов диабета. После многих безуспешных попыток в 1922 г. все же удалось выделить в чистом виде активный фактор, присутствующий в экстракте поджелудочной железы. Он был назван инсулином (т.е. «островковым веществом»), поскольку к тому времени уже было известно, что именно островковая ткань служит источником гормона. Вскоре инсулин стал применяться для лечения лю-

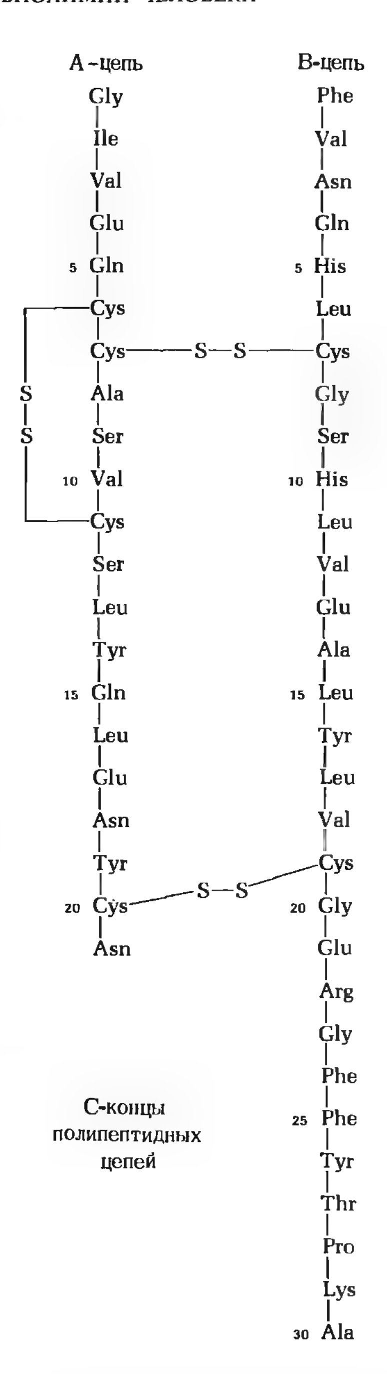


Рис. 25-16. Аминокислотные последовательности A- и B-цепей инсулина крупного рогатого скота.

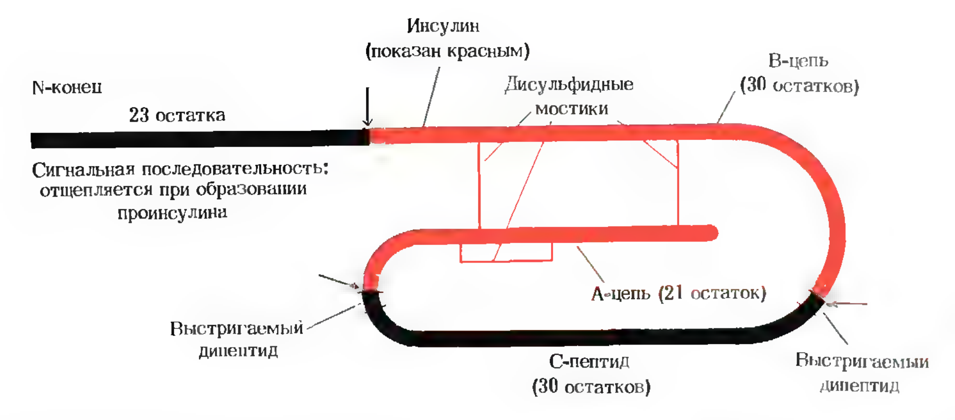


Рис. 25-17. Образование инсулина. Исходным предшественнком инсулина является препроинсулин (полная структура показана внизу), который после ферментативного отщепления с N-конца 23 аминокислотных остатков превращается в проинсулин. Проинсулин в свою очередь подвергается действию пептидаз в двух местах, показанных стрелками, и превращается в инсулин (выделен красным цветом). Далее с каждого конца вырезанного промежуточного пептида отщепляется по дипептиду, после чего остается С-пептид, содержащий 30 аминокислотных остатков.

дей, страдающих диабетом, и с тех пор стал одним из важнейших терапевтических средств, известных медицине; он спас или продлил жизнь огромному числу людей.

Инсулин представляет собой небольшой белок с мол. массой 5700, состоящий из двух полипептидных цепей, А и В, соединенных друг с другом двумя дисульфидными мостиками (рис. 25-16). Напомним, что инсулин -это первый белок, для которого была установлена аминокислотная последовательность (разд. 6.8). Используемый в медицине препарат инсулина выделяют из ткани поджелудочных желез животных, забиваемых на бойнях.

Инсулин синтезируется В- или β-клетками поджелудочной железы в виде неактивного предшественника. Непосредственным предшественником инсулина является *проинсулин* - одноцепочечный полипептид, содержащий в зависимости от вида животного от 78 до 86 аминокислотных остатков (рис. 25-17). Проинсулин из поджелудочной железы крупного рогатого скота состоит из 81 остатка и имеет три межцепочечных дисульфидных мостика. Он накапливается в гранулах внутри В-клеток островковой ткани и сохраняется в них до тех пор, пока клетки не получат сигнал о необходимости его выделения. В этот момент проинсулин превращается в активный инсулин под действием специфических пептидаз, которые расщепляют две пептидные связи в цепи проинсулина, вырезая из нее средний фрагмент. Далее в результате действия пептидазы с обоих концов этого фрагмента отщепляются по два аминокислотных остатка (рис. 25-17) и образуется *С-пептид*. Два концевых фрагмента исходной цепи проинсулина становятся соответственно А- и В-цепями инсулина, которые удерживаются вместе посредством дисульфидных мостиков.

Проинсулин в свою очередь также образуется из своего предшественника, а именно из *препроинсулина*, который по сравнению с проинсулином содержит дополнительно 23 аминокислотных остатка на N-конце (рис. 25-17). При образовании проинсулина эта N-концевая последовательность отщепляется специальной пептидазой. Это генетически детерминированная лидерная, или сигнальная, последовательность, благодаря которой новосинтезированный проинсулин попадает в предназначенное ему место в клетке, а именно в секреторные гранулы. Как мы увидим в гл. 29, такие сигнальные последовательности включаются во многие белки во время их синтеза.

25.12. Секреция инсулина регулируется в первую очередь концентрацией глюкозы в крови

Секреция инсулина из В-клеток островков Лангерганса в кровь представляет собой сложный процесс; он идет при участии ионов Ca^{2+}, и его последний этап – это выделение в кровь содержимого секреторных гранул, в которых образуются инсулин и С-пептид. Скорость секреции инсулина зависит в первую очередь от концентрации глюкозы в крови – она тем выше, чем выше концентрация глюкозы. Повышение концентрации инсулина ускоряет поступление глюкозы из крови в печень и мышцы, где она в основном превращается в гликоген. При этом концентрация глюкозы в крови падает до нормального уровня, что в свою очередь приводит к замедлению секреции инсулина, скорость которой снижается до нормы. Таким образом, между скоростью секреции инсулина и концентрацией глюкозы в крови существует хорошо отлаженная обратная связь.

25.13. Вторичный посредник действия инсулина еще неизвестен

Рецепторы инсулина были обнаружены на поверхности клеток печени, скелетных мышц, а также клеток жировой ткани (адипоцитов). Эти рецепторы были выделены из клеточных мембран и очищены. Выделенный рецептор инсулина является специфическим гликопротеином, который очень прочно связывает инсулин. Число рецепторов инсулина на поверхности клетки меняется в зависимости от условий обмена веществ; показано также, что они обладают высокой скоростью оборота. Несмотря на интенсивные исследования, проводящиеся на протяжении многих лет, до сих пор не удается обнаружить вторичный посредник, высвобождающийся при связывании инсулина с его рецепторами. Известно лишь, что в механизме, запускающем действие инсулина, важную роль играют внутриклеточные ионы Ca^{2+}; принципиально важным представляется также то, что при воздействии инсулина на клетки печени в них резко возрастает активность митохондриальной пируватдегидрогеназы (разд. 16.2). Вопрос о внутриклеточном посреднике действия инсулина является одним из наиболее важных в биохимии, поскольку его идентификация безусловно имела бы фундаментальное значение для понимания природы диабета и повышения эффективности лечения этого заболевания.

25.14. Инсулин влияет на многие процессы обмена веществ

В гл. 24 был описан целый ряд других изменений обмена веществ, наблюдающихся при недостатке инсулина. Так, у больных диабетом или у животных с экспериментальным диабетом, вызванным удалением поджелудочной железы либо разрушением островковой ткани путем введения *аллоксана* (рис. 25-18), утрачивается способность к синтезу жирных кислот и липидов из глюкозы. При этом скорость окисления жирных кислот превышает норму, что приводит к образованию избытка кетоновых тел, накапливающихся в тканях, крови и моче, т.е. к так называемому *кетозу*. У животных с экспериментальным диабетом снижается также скорость переноса аминокислот из крови в клетки периферических тканей, вследствие чего замедляется биосинтез белков. Вместо этого аминокислоты подвергаются в печени дезаминированию, и из их углеродных цепей в ходе глюконеогенеза (разд. 20.1) образуется глюкоза, посту-

Рис. 25-18. Структура аллоксана – пиримидинового производного, вызывающего экспериментальный диабет у животных путем разрушения островковых клеток.

Таблица 25-6. Метаболические сдвиги при инсулиновой недостаточности (сахарный диабет)

Ускорение гликогенолиза в печени
Увеличение глюконеогенеза
Снижение количества глюкозы, поступающей в периферические ткани
Гипергликемия
Глюкозурия
Ускорение процесса окисления жирных кислот в печени
Образование избыточного количества кетоновых тел
Кетонурия
Снижение биосинтеза жирных кислот
Снижение синтеза белков в периферических тканях
Повышение образования и экскреции мочевины

пающая в кровь. Эти нарушения метаболизма (табл. 25-6) исчезают при введении инсулина.

Весь комплекс метаболических сдвигов, обусловленный недостаточностью инсулина, можно рассматривать как свидетельство того, что при диабете организм стремится превратить все имеющиеся в его распоряжении питательные вещества в глюкозу крови. Ткани остро нуждаются в глюкозе, и печень напряженно синтезирует ее, однако это приводит только к тому, что бóльшая часть глюкозы «уходит» в мочу. Согласно этому взгляду на нарушение обмена веществ при диабете, ткани больного оказываются не способными поглощать глюкозу из крови при ее нормальном уровне, составляющем ~4,5 мМ; для эффективного поглощения им требуется гораздо более высокая концентрация глюкозы. Однако при увеличении концентрации глюкозы в крови свыше 10 мМ, т. е. выше порогового значения для почек, избыток глюкозы выделяется с мочой, что приводит к потере больших количеств глюкозы организмом.

Другие серьезные нарушения обмена веществ при сахарном диабете не поддаются лечению инсулином. В частности, при диабете нарушается биосинтез базальной мембраны кровеносных капилляров, что приводит к повреждению кровеносных сосудов сердца, почек, конечностей и сетчатки глаза. В связи с этим на поздних стадиях диабет дает такие осложнения, как слепота и почечная недостаточность. По-видимому, инъекция больным инсулина один раз в день не может обеспечить те флуктуации уровня инсулина в крови, которые ежечасно и даже ежеминутно происходят в здоровой островковой ткани в ответ на колебания концентрации глюкозы в крови. В связи с этим возникает необходимость разработки автоматических устройств для введения инсулина в систему кровообращения больных со скоростью, зависящей от концентрации глюкозы в крови. Такие устройства позволили бы более точно имитировать секреторную функцию нормальной островковой ткани в организме.

25.15. Глюкагон – гипергликемический гормон поджелудочной железы

Глюкагон, также полипептидный гормон, секретируется А-клетками островковой ткани поджелудочной железы и родственными по происхождению клетками желудочно-кишечного тракта. Это одноцепочечный полипептид, состоящий из 29 аминокислотных остатков и имеющий мол. массу 3500 (рис. 25-19). Недавние исследования показали, что у глюкагона, как и у инсулина, есть два неактивных предшественника: *проглюкагон* и *препроглюкагон*. Последний из них содержит на N-конце сигнальную полипептидную последовательность, которая отщепляется в два этапа, что ведет к образованию проглюкагона.

Глюкагон вызывает повышение концентрации глюкозы в крови, т. е. его действие противоположно действию инсулина (табл. 25-6). Гипергликемический эффект глюкагона достигается двумя путями. Первый из них состоит в том, что глюкагон способствует распаду гликогена печени с образованием глюкозы, поступающей в кровь, причем механизм этого действия подобен механизму действия адреналина. На наружной поверхности плазматической мембраны клеток



Рис. 25-19. Структуры проглюкагона и глюкагона крупного рогатого скота. Глюкагон состоит из 29 аминокислотных остатков и имеет мол. массу 3500. Он образуется в результате ферментативного отщепления восьми аминокислотных остатков (показаны красным цветом) от С-конца проглюкагона.

печени имеются специфические рецепторы глюкагона. При связывании с ними глюкагона в плазматической мембране включается каскад усиления, подобно тому как это происходит при действии адреналина (рис. 25-11). Второй путь состоит в том, что глюкагон в отличие от адреналина ингибирует гликолитический распад глюкозы до лактата. Этот эффект обусловлен непрямым ингибированием L-изофермента (печеночного типа) *пируваткиназы* (разд. 15.13), участвующей в гликолизе. Глюкагон отличается от адреналина также тем, что обладает намного более продолжительным действием; кроме того, он не повышает частоты сердечных сокращений и кровяного давления.

25.16. Соматостатин тормозит секрецию инсулина и глюкагона

Соматостатин, также полипептидный гормон (рис. 25-20), впервые был обнаружен в экстрактах гипоталамуса, где он служит ингибитором секреции соматотропина и других гормонов передней доли гипофиза (см. след. раздел). Соматостатин синтезируется в D-клетках островковой ткани поджелудочной железы и в близких им по происхождению клетках желудочно-кишечного тракта. Соматостатин, образующийся в поджелудочной железе, сложным образом воз-

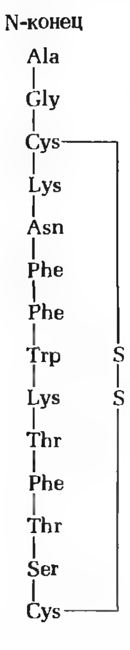


Рис. 25-20. Структура соматостатина овцы. Соматостатин содержит одну внутрицепочечную дисульфидную связь. Он синтезируется гипоталамусом, островковыми клетками поджелудочной железы и особыми клетками кишечника.

действует на секрецию инсулина и глюкагона. Он используется при лечении некоторых форм сахарного диабета.

25.17. Соматотропин также влияет на действие инсулина

Соматотропин, или *гормон роста*, секретируемый передней долей гипофиза, впервые был выявлен по способности вызывать рост скелета и увеличение веса тела молодых животных. Недостаточность этого гормона приводит к *карликовости* (рис. 25-21). Избыточная же его секреция выражается в *гигантизме* или *акромегалии*, при которой происходит усиленный рост кистей рук, ступней и особенно лицевых костей, приводящий к развитию массивной нижней челюсти и тяжелых надбровий. Соматотропин оказывает также глубокое воздействие на метаболизм углеводов. Введение животным избытка соматотропина вызывает *гипофизарный диабет*, обусловленный тем, что соматотропин тормозит секрецию инсулина. Соматотропин представляет собой полипептид, состоящий из 191 аминокислотного остатка (мол. масса 21000). Как указывалось выше, секрецию этого гормона тормозит гипоталамический соматостатин.



Рис. 25-21. «Генерал» Том Там, страдавший, по-видимому, недостаточностью соматотропина, со своим цирковым импресарио П. Т. Барнумом.

Гипергликемия

↑ Возникает под действием:
глюкагона,
соматотропина,
глюкокортикоидов,
адреналина

Нормальный уровень глюкозы в крови

↓ Возникает под действием:
инсулина,
соматостатина

Гипогликемия

Рис. 25-22. Гормональная регуляция уровня глюкозы в крови.

На рис. 25-22 показаны сложные взаимосвязи в гормональной регуляции метаболизма глюкозы, на который воздействуют гормоны пяти разных эндокринных желез, включая кору надпочечников (см. ниже).

25.18. Гормоны коры надпочечников являются стероидами

Гормоны коры надпочечников, андрогены и *эстрогены* – это основные жирорастворимые стероидные гормоны. Мы начнем с гормонов коры надпочечников, поскольку наряду с другими функциями они также влияют на обмен углеводов. Секреция гормонов коры надпочечников регулируется гипоталамусом. В ответ на стрессовые ситуации гипоталамус выделяет кортиколиберин, который, попадая в переднюю долю гипофиза, стимулирует высвобождение *кортикотропина* и его поступление в кровь. Кортикотропин представляет собой полипептид, состоящий из 39 аминокислотных остатков (разд. 6.9). Его концентрация в крови колеблется в норме от 10^{-11} до 10^{-12} М.

Поскольку период полужизни этого гормона в крови составляет всего лишь 10 мин, ясно, что в условиях стационарного состояния он постоянно синтезируется и распадается. Кортикотропин связывается с рецепторами, расположенными на поверхности клеток коры надпочечников, стимулируя синтез этими клетками характерных для них стероидных гормонов. В коре надпочечников синтезируется свыше 30 стероидов. Их называют *кортикоидами* (кортикостероидами) и разделяют на три основные группы. Первую группу составляют глюкокортикоиды, важнейшим представителем которых является *кортизол* (рис. 25-23); по ряду эффектов гормоны этой группы противоположны инсулину. Кортизол стимулирует процесс глюконеогенеза из аминокислот и способствует накоплению гликогена в печени; он также повышает уровень глюкозы в крови и снижает использование глюкозы в периферических тканях. Кроме того, он улучшает утилизацию жирных кислот и стимулирует образование кетоновых тел. Глюкокортикоиды оказывают также выраженное противовоспалительное и антиаллергическое действие. Избыточная секреция глюкокортикоидов является причиной болезни Кушинга, для которой характерны такие признаки, как утомляемость и потеря мышечной массы (из-за повышенной скорости превращения аминокислот в глюкозу), а также перераспределение жира в организме, что, в частности, приводит к лунообразности лица.

Вторая группа стероидов коры надпочечников – это *минералокортикоиды*, функция которых состоит в том, что они способствуют задержке ионов Na^+ и выведению ионов K^+ почками; таким путем эти гормоны поддерживают водно-солевой баланс в организме. Важнейшим минералокортикоидом является *альдостерон* (рис. 25-23). Этот гормон обладает также слабой глюкокортикоидной активностью; вместе с тем и кортизол проявляет слабую минералокортикоидную активность.

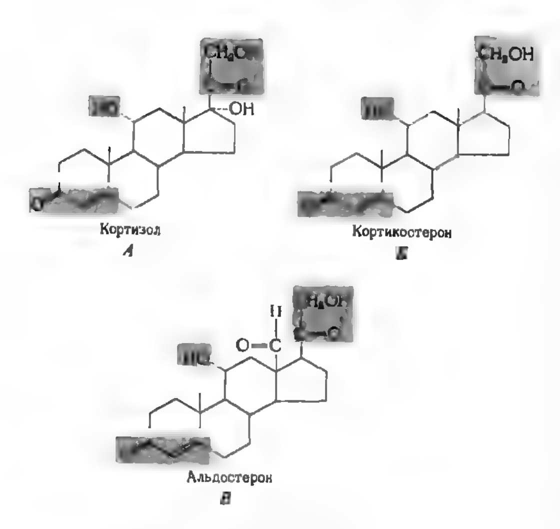


Рис. 25-23. Три основных стероидных гормона коры надпочечников. Одинаковые участки структуры показаны на красном фоне. Все три гормона обладают как глюкокортикоидной, так и минералокортикоидной активностью, однако кортизол проявляет в основном глюкокортикоидное действие, а альдостерон – в основном минералокортикоидное. Кортикостерону обе активности свойственны в равной мере. *А*. Глюкокортикоид кортизол стимулирует глюконеогенез из аминокислот и обладает антивоспалительной активностью. *Б*. Кортикостерон проявляет как глюкокортикоидное, так и минералокортикоидное действие. *В*. Минералокортикоид альдостерон вызывает задержку выведения ионов Na^+ и потерю ионов K^+ с мочой.

Стероиды коры надпочечников, принадлежащие к третьей группе, занимают по своим свойствам промежуточное положение между глюко- и минералокортикоидами. Основной гормон этой группы – *кортикостерон*. Как видно на рис. 25-23, для кортикостероидов всех трех групп характерен ряд общих элементов структуры.

Гормоны коры надпочечников растворяются в липидах и легко проходят через клеточные мембраны тканей-мишеней в цитоплазму, где они соединяются со специфическими внутриклеточными белками-рецепторами. Образовавшиеся гормон-рецепторные комплексы, которые можно рассматривать в качестве внутри-

клеточных посредников, проникают в клеточное ядро. Там они регулируют транскрипцию определенных генов и тем самым способствуют биосинтезу специфических ферментов и белков, ответственных за конечное действие данных гормонов.

Недостаточная секреция гормонов коры надпочечников служит причиной аддисоновой болезни, для которой характерны утомляемость, слабость, пигментация кожи и тяга к соленому. Больные при этом очень чувствительны к стрессам и инфекциям.

25.19. Тиреоидные гормоны регулируют скорость метаболизма

Щитовидная железа секретирует два характерных гормона – L-тироксин и L-трииодтиронин (рис. 25-24). Подобно адреналину, эти два гормона, сокращенно обозначаемые как Т4 и Т3 соответственно, являются производными тирозина. Тиреоидные гормоны вырабатываются в ответ на сигналы, поступающие в гипоталамус, который секретирует *тиролиберин*, а также ингибитор высвобождения тиротропина. Тиролиберин стимулирует выделение тиротропина из передней доли гипофиза и его поступление в кровь. Тиротропин связывается со специфическими рецепторами на клетках щитовидной железы и стимулирует выработку ими тиреоидных гормонов. Тироксин и трииодтиронин синтезируются в последовательности ферментативных реакций, начинающейся с иодирования остатков L-тирозина в *тироглобулине* (гликопротеин с мол. массой 650000), в результате которого они превращаются в остатки L-моноиодтирозина (рис. 25-24). Необходимый для реакции иод, который является незаменимым микроэлементом (гл. 26), поступает в щитовидную железу с кровью. Иод интенсивно связывается и накапливается тироглобулином, называемым также *коллоидным белком*, и затем используется для иодирования остатков тирозина в тироглобулине. На последующих этапах синтеза тиреоидного гормона остатки иодтиро-

А — Тироксин (L-3,5,3′,5′-тетраиодтиронин): HO–(3′,5′-дииодфенил)–O–(3,5-дииодфенил)–CH_2–CH($^+NH_3$)–COO^-

Б — Трииодтиронин (L-3,5,3′-трииодтиронин): HO–(3′-иодфенил)–O–(3,5-дииодфенил)–CH_2–CH($^+NH_3$)–COO^-

В — L-3-моноиодтирозин: HO–(3-иодфенил)–CH_2–CH($^+NH_3$)–COO^-

Рис. 25-24. Тиреоидные гормоны (*А* и *Б*) и моноиодтирозин (*В*) – первый иодированный предшественник тиреоидных гормонов.

зина остаются связанными с тироглобулином. Почти весь новообразованный тироксин и трииодтиронин сохраняют связь с тироглобулином в тиреоидных пузырьках до тех пор, пока они не поступят в кровь, высвободившись под действием протеолитических ферментов. Полагают, что тироксин является предшественником, или прогормоном, трииодтиронина, стимулирующего обмен веществ.

Далее тиреоидные гормоны попадают с током крови в органы-мишени. На большинство тканей тиреоидные гормоны оказывают стимулирующее действие; примечательное исключение составляют только мозг взрослого человека и некоторые репродуктивные ткани. Особенно сильно тиреоидные гормоны стимулируют метаболизм печени и мышц. Они связываются со специфическими рецепторными белками, которые в свою очередь обеспечивают проникновение тироксина в клеточное ядро. В результате взаимодействия тироксин-рецепторных комплексов со специфическими генами в клетках-мишенях резко возрастает синтез определенных ферментов и ферментных систем. Главный результат действия тиреоидных гормонов

состоит в увеличении *скорости основного обмена животного.*

Скорость основного обмена (или базальная скорость метаболизма, БСМ) – это мера потребления кислорода организмом в состоянии полного покоя спустя 12 ч после еды в расчете на единицу площади поверхности тела. Величина БСМ для больного выражается в виде отклонения (в процентах) от нормального значения БСМ, т.е. в виде процентного отклонения от нормы для индивидов того же пола, веса и роста. Измерения БСМ проводятся при диагностике заболеваний, связанных с нарушением функции щитовидной железы. Состояние, вызванное повышенной секрецией тиреоидных гормонов, называется *гипертиреоз*. Скорость основного обмена при этом увеличена, пища сгорает быстрее, чем в норме, больные выделяют больше тепла, и им свойственна повышенная возбудимость. Недостаточность секреции тиреоидных гормонов, т.е. *гипотиреоз*, выражается в пониженной скорости основного обмена. Для больных с гипотиреозом характерны более медленное, чем в норме, сгорание пищи в организме, выделение меньшего количества тепла и некоторая общая медлительность. Недостаточность иода в пище приводит к базедовой болезни (гл. 26), сопровождающейся сильным увеличением щитовидной железы, что обусловлено накоплением очень большого по сравнению с нормой количества коллоидного белка, который предназначен захватывать минимальные количества иода, циркулирующего в крови.

Вопрос о том, каким образом осуществляется регуляция скорости аэробного обмена тиреоидными гормонами, остается загадкой, несмотря на многочисленные исследования в этой области. Неясно, в частности, как осуществляется влияние гормонов щитовидной железы на активность митохондрий, в которых протекают в основном процессы дыхания и образования ATP. Тиреоидные гормоны способны также ускорять созревание и развитие некоторых тканей. Они стимулируют, например, метаморфоз головастика во взрослую лягушку.

25.20. Половые гормоны являются стероидами

Подобно гормонам коры надпочечников, *андрогены* (мужские половые гормоны) и *эстрогены* (женские половые гормоны) являются стероидами. Кора надпочечников, семенники и яичники имеют общее эмбриональное происхождение. Их сходство проявляется, однако, не только в этом. Андрогены, например, синтезируются не только в семенниках, но и (правда, в меньших количествах) в коре надпочечников и в яичниках. Аналогично эстрогены образуются не только в яичниках, но и в коре надпочечников, и в семенниках. В принципе половые признаки определяются соотношением секретируемых андрогенов и эстрогенов. Все стероидные гормоны в конечном итоге образуются из общего предшественника – холестерола, который в свою очередь синтезируется из ацетил-CoA (разд. 21.16). Химические формулы важнейших половых стероидных гормонов представлены на рис. 25-25.

Андрогены стимулируют рост и созревание, поддерживают функционирование репродуктивной системы и формирова-

OH
O
Тестостерон
А

OH
HO
β-Эстрадиол
Б

CH_3
C=O
O
Прогестерон
В

Рис. 25-25. Три основных половых гормона. *А*. Тестостерон основной андроген (мужской половой гормон). *Б*. β-Эстрадиол - основной эстроген (женский половой гормон), образуемый из тестостерона. *В*. Прогестерон - гормон желтого тела. В женском организме он служит предшественником как тестостерона, так и β-эстрадиола.

ние вторичных половых признаков мужского организма; эстрогены регулируют активность женской репродуктивной системы. Вместе с тем и андрогены, и эстрогены оказывают значительное и разнообразное действие на большинство тканей организма, не связанных с репродукцией. Например, андрогены стимулируют рост скелетных мышц. Андрогены и некоторые их производные называют также *анаболическими стероидами.* Их принимают многие штангисты, футболисты и борцы с целью увеличения мышечной массы и силы. Однако в большинстве видов спорта применение анаболиков не дает заметных преимуществ. Известно также, что анаболические стероиды использовали некоторые женщины-атлеты и, по-видимому, с успехом; следует иметь в виду, однако, что эти гормоны оказывают побочное маскулинизирующее действие.

Третий половой гормон – *прогестерон* (рис. 25-25) - служит предшественником в биосинтезе стероидов коры надпочечников и половых гормонов. Одна из его функций состоит также в том, что он стимулирует имплантацию яйца.

25.21. Механизм действия эстрогенов на клетки-мишени постепенно проясняется

Основным эстрогеном в организме женщины является β-эстрадиол, образующийся в яичниках из, как это ни парадоксально, основного мужского полового гормона тестостерона (рис. 25-26). Поистине, не только из ребра Адама была создана Ева! Специфические внутриклеточные рецепторы β-эстрадиола содержатся в первичных тканях-мишенях — матке и молочных железах. Эстрогенный рецептор, называемый эстрофилином I, имеет мол. массу ~ 200000. При связывании молекулы эстрогена эстрофилин I претерпевает молекулярные изменения, превращаясь в эстрофилин II, который можно рассматривать как вторичный посредник в действии эстрогена. Эстрофилин II входит в клеточное ядро, где взаимодействует с хроматином, вызывая активацию определенных генов и синтез

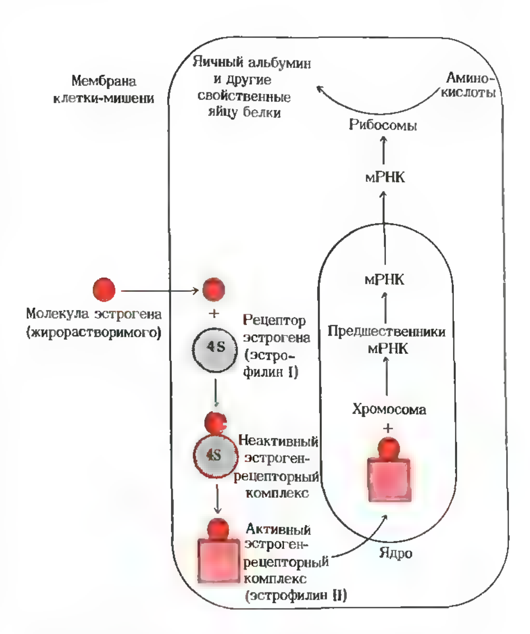


Рис. 25-26. Схема, иллюстрирующая действие эстрогена на клетки-мишени в яйцеводе курицы. Будучи жирорастворимым соединением, эстроген проходит через клеточную мембрану и связывается с эстрогенным рецептором белком с коэффициентом седиментации 4S. Далее эстроген-рецепторный комплекс превращается в активную 5S-форму и в качестве вторичного посредника проникает в ядро, где, взаимодействуя со специфическими участками хроматина, вызывает транскрипцию определенных генов с образованием соответствующих мРНК. Последние выходят из ядра и используются в качестве матриц белкового синтеза на рибосомах. В результате синтезируется ряд белков, характерных для яйцеводов в стимулированном состоянии, например овальбумин.

специфических белков, появление которых характерно для стимулированных придаточных органов репродуктивной системы (рис. 25-26). Например, введение эстрадиола цыплятам вызывает значительное увеличение скорости синтеза в яйцеводе особых белков яйца, в частности *овальбумина и ововителлина.* Таким путем эстрадиол подготавливает яичник к формированию яиц.

Число рецепторов эстрогенов в молочной железе женщин снижается при развитии и росте рака груди. Измерение количества эстрогенных рецепторов в небольшом образце ткани молочной железы используется в качестве диагностического теста при определении стадии заболе-

вания и назначении лечения. Развитие рака груди, выявленного в ранней стадии, удается иногда приостановить путем изменения соотношения андрогенов и эстрогенов в организме.

25.22. В организме имеется много других гормонов

Помимо рассмотренных было открыто много других гормонов, однако мы пока мало что знаем о биохимических механизмах их действия. Некоторые из них перечислены в табл. 25-7, где указаны также их основные функции. Особенно примечателен предшественник гормонов передней доли гипофиза – *проопиокортин* (рис. 25-27). Название этого длинного полипептида, состоящего приблизительно из 260 аминокислотных остатков, связано с тем, что он служит предшественником как опиатоподобных гормонов, так и гормонов, стимулирующих кору надпочечников. Действительно, при пептидазном расщеплении проопио-

Таблица 25-7. Перечень ряда других важных полипептидных гормонов

Гормон и его источник	Мол. масса	Действие
Паратиреоидный гормон (паращитовидные железы)	9500	Стимулирует выход ионов Ca^{2+} из костей; регулирует задержку ионов Ca^{2+} почками
Кальцитонин (щитовидная железа)	3600	Тормозит выход ионов Ca^{2+} из костей
Тимозин (тимус)	12 500	Усиливает рост лимфоидной ткани
Гастрин (желудок)	2000	Стимулирует желудочную секрецию
Секретин (тонкий кишечник)	3500	Усиливает секрецию сока поджелудочной железы
Холецистокинин (тонкий кишечник)	4200	Усиливает секрецию пищеварительных ферментов

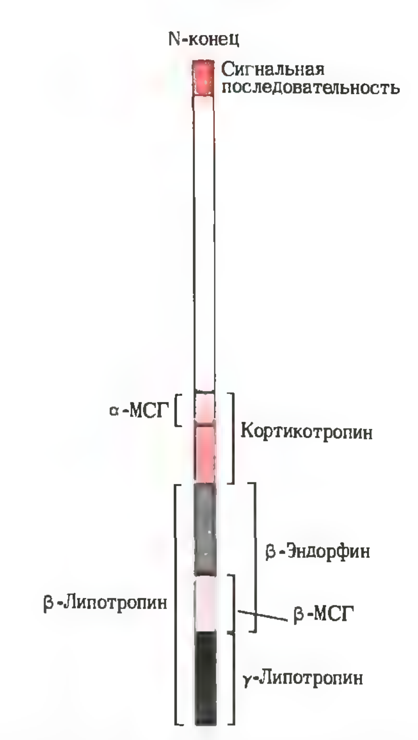


Рис. 25-27. Пропиокортин – предшественник нескольких гормонов передней доли гипофиза. Он состоит приблизительно из 260 аминокислотных остатков. В результате расщепления полипептидной цепи в участках, указанных на рисунке, образуется несколько гормонов: два меланоцитстимулирующих гормона (α- и β-МСГ), β- и γ-липотропины, кортикотропин и β-эндорфин.

кортина в определенных местах из него образуется ряд гормонов (рис. 25-27), в том числе два липотропина, стимулирующих использование липидов в качестве топлива, и два типа эндорфинов — гормонов с анальгезирующим (обезболивающим) действием, подобных морфину и другим наркотическим препаратам. Эндорфины – это «собственный опий организма». Пентапептид, включающий первые пять остатков с N-конца эндорфина, представляет собой так называемый *энкефалин* («находящийся в мозгу»), который связывается с опиатными рецепторами мозга и обладает очень высокой морфиноподобной активностью. Упомянутые выше открытия, сделанные в последние годы, ведут к созданию новых представлений о биохимических механизмах боли и наркомании.

25.23. Простагландины и тромбоксаны оказывают влияние на действие ряда гормонов

Простагландины (рис. 25-28) представляют собой семейство жирорастворимых органических кислот, содержащих пятиуглеродные кольца; они образуются из незаменимых жирных кислот (разд. 21.6) через *арахидоновую кислоту* (ненасыщенная жирная кислота). Эти соединения служат регуляторами действия гормонов; они получили свое название простагландинов потому, что впервые были обнаружены в секрете предстательной железы. Сначала предполагалось, что простагландины регулируют активность мужских репродуктивных тканей, однако в дальнейшем выяснилось, что они образуются и функционируют практически во всех органах. Эти вещества оказывают разнообразное физиологическое действие, и некоторые из них используются как терапевтические средства. Ряд простагландинов стимулирует и усиливает действие аденилатциклазы. Лабильными продуктами превращения простагландинов являются *тромбоксаны* (рис. 25-28), участвующие, как предполагают, в регуляции активности тромбоцитов и других клеток. Следует отметить, что аспирин, хорошее болеутоляющее средство при артрите, служит мощным ингибитором простагландин-синтазы – фермента, участвующего в биосинтезе простагландинов из арахидоновой кислоты. Создается впечатление, что определенные простагландины играют какую-то роль в регуляции процесса восприятия боли.

Арахидоновая кислота

Простагландин E_2

Тромбоксан B_2

Рис. 25-28. Типичный простагландин (E_2) и тромбоксан (B_2), образующиеся из арахидоновой кислоты (разд. 21.6).

Предполагается также, что в качестве модуляторов и даже внутриклеточных посредников действия некоторых гормонов функционируют ионы Ca^{2+} и цитоплазматический Ca^{2+}-связывающий белок *кальмодулин*. Свободные ионы Ca^{2+} присутствуют в цитозоле в очень низких концентрациях – менее 10^{-6} М. При действии некоторых гормонов концентрация ионов Ca^{2+} возрастает. Ионы Ca^{2+} влияют на многие виды внутриклеточной активности, вероятно, посредством связывания с кальмодулином, который стимулирует фосфодиэстеразу и различные протеинкиназы, участвующие в углеводном обмене, мышечном сокращении и механизмах внутриклеточного мембранного транспорта.

Краткое содержание главы

Гормоны – это химические посредники, секретируемые в кровь определенными тканями и выполняющие функцию регуляторов активности других тканей. Гормоны действуют в рамках функциональной иерархии. Нервные импульсы, поступающие в гипоталамус, вызывают выделение специфических гипоталамических гормонов, которые попадают в гипофиз и стимулируют (либо тормозят) высвобождение им различных тропных гормонов. Гормоны передней доли гипофиза в свою очередь стимулируют выделение гормонов другими эндокринными железами, которые секретируют гормоны, действующие на специфические ткани-мишени.

Адреналин – один из трех гормонов-катехоламинов, синтезирующихся из тирозина в мозговом слое надпочечников, – помогает организму подготовиться к борьбе или бегству путем повышения уровня глюкозы в крови за счет мобили-

зации ее запасов в гликогене или в других источниках. Адреналин связывается со специфическими рецепторами, расположенными на наружной поверхности клеток печени и мышц, и тем самым активирует аденилатциклазу – фермент, расположенный на внутренней поверхности клеточной мембраны и превращающий ATP в циклический аденозинмонофосфат (cAMP). Далее cAMP связывается с регуляторной субъединицей протеинкиназы, что вызывает высвобождение каталитической субъединицы и тем самым ее активацию. Протеинкиназа фосфорилирует неактивную киназу фосфорилазы, которая на следующем этапе стимулирует гликоген-фосфорилазу. cAMP разрушается фосфодиэстеразой, которая активируется в присутствии ионов Ca^{2+} и регуляторного Ca^{2+}-связывающего белка кальмодулина; ингибитором фосфодиэстеразы является теофиллин.

Инсулин, один из трех основных гормонов поджелудочной железы, секретируется В-клетками островков Лангерганса. Избыток инсулина приводит к снижению уровня сахара в крови, поскольку при этом активируется переход глюкозы из крови в ткани. Недостаточность инсулина является причиной сахарного диабета, характеризующегося гипергликемией, глюкозурией и торможением синтеза жирных кислот, а также активацией окисления жирных кислот и образования кетоновых тел. Инсулин связывается со специфическими инсулиновыми рецепторами на поверхности клеток многих тканей, но механизм его внутриклеточного действия остается пока неизвестным. Глюкагон, секретируемый А-клетками, оказывает противоположное инсулину действие – он вызывает распад гликогена печени и поступление глюкозы в кровь. Еще один гормон поджелудочной железы – соматостатин – регулирует секрецию инсулина.

Кора надпочечников секретирует ряд гормонов, известных под общим названием кортикостероидов, а именно: 1) глюкокортикоиды, в частности кортизол, который стимулирует глюконеогенез, а также подавляет воспалительные реакции; 2) минералокортикоиды, главным образом альдостерон, который задерживает выведение ионов Na^{+}; 3) другие стероиды промежуточного действия, например кортикостерон. Кортикостероиды, а также эстрогены и андрогены проходят через плазматические мембраны соответствующих клеток-мишеней и связываются с рецепторами в цитозоле. Далее гормон-рецепторный комплекс воздействует на ядро, вызывая экспрессию определенных генов.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

White A., Handler P., Smith E. L., Hill R. L., Lehman I. R. Principles of Biochemistry, 6th ed., McGraw-Hill, New York, 1978. В главах 41–48 обобщены сведения о гормонах и механизме их действия; приводится также обширная библиография.

Специальная

Bradshaw R. A., Frazier W. A. Hormone Receptors as Regulators of Hormone Action, Curr. Top. Cell Regul., **12**, 1–35 (1977).

Guillemin R. Endorphins: Brain Peptides That Act Like Opiates, New Engl., J. Med., **296**, 226–228 (1977).

Guillemin R. Peptides in the Brain: The New Endocrinology of the Neuron, Science, **202**, 390–402 (1978).

Greengard P. Phosphorylated Proteins as Physiological Effectors, Science, **199**, 146–152 (1978).

Jensen E. V. Estrogen Receptors in Human Cancers, JAMA, **238**, 59 (1977).

Means A. R., Dedham J. R. Calmodulin: An Intracellular Calcium Receptor, Nature, **285**, 73–77 (1980).

Notkins A. L. The Causes of Diabetes, Sci. Am., **241**, 62–73, November (1979).

O'Malley B. W., Schrader W. T. The Receptors of Steroid Hormones, Sci. Am., **234**, 32 (1976).

Pastan L. Cyclic AMP, Sci. Am., **227**, 97–105, August (1972).

Renold A. E., Mintz D. H., Muller W. A., Cahill G. F., Jr. Diabetes Mellitus. In: Stanbury J. B., Wyngaarden J. B. and Fredrickson D. S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 1978. Подробное описание различных форм сахарного диабета.

Ryan A. J. Anabolic Steroids Are Fool's Gold, Fed. Proc., **40**, 2682–2688 (1981). Любопытная дискуссия об использовании стероидов спортсменами.
Snyder S. H. Opiate Receptors and Internal Opiates, Sci. Am., **236**, 44–56, March (1977).
Steiner D. F. Insulin Today, Diabetes, **26**, 322–340 (1977).
Sutherland E. W. Studies on the Mechanism of Hormone Action, Science, **177**, 401-408 (1972). Описание классических опытов с циклическим AMP.
Yalow R. S. Radioimmunoassay: A Probe for the Fine Structure of Biologic Systems. Science, **200**, 1236-1246 (1978).

Вопросы и задачи

1. *Значение концентрации гормона.* В нормальных условиях скорость секреции адреналина ($C_9H_{13}NO_3$) мозговым слоем надпочечников человека такова, что концентрация этого гормона в крови поддерживается на уровне 10^{-10} М. Для того чтобы оценить, что означает эта концентрация, рассчитайте, каков должен быть диаметр (в метрах) бассейна глубиной 2 м, чтобы при растворении в нем 1 г (около 1 чайной ложки) адреналина концентрация адреналина оказалась равной его физиологической концентрации в крови.
2. *Регуляция уровня гормонов в крови.* Время жизни большинства гормонов в крови сравнительно невелико. Так, если ввести животному радиоактивно меченный инсулин, то половина введенного гормона исчезнет из крови в течение 30 мин. Почему важна относительно быстрая инактивация циркулирующих гормонов? Как может обеспечиваться постоянство уровня гормона в крови в нормальных условиях, если учитывать его быструю инактивацию? Какими путями организм осуществляет быстрые изменения концентрации циркулирующих гормонов в организме?
3. *Сравнение водорастворимых и жирорастворимых гормонов.* На основании физических свойств гормоны разделяют на две группы: 1) хорошо растворимые в воде, но плохо растворимые в липидах, например адреналин, и 2) плохо растворимые в воде, но хорошо растворимые в липидах, например стероиды. В качестве регуляторов клеточной активности большинство водорастворимых гормонов отличается тем, что не проникает внутрь клеток-мишеней; жирорастворимые гормоны, напротив, проникают в клетки-мишени и в конечном итоге воздействуют на ядро. Какова основа корреляции между растворимостью, локализацией рецепторов и механизмом действия гормонов указанных двух групп?
4. *Опыты с гормонами на бесклеточных системах.* В 50-х годах Эрл Сэзерленд и его коллеги провели свои пионерские опыты по выяснению механизма действия адреналина и глюкагона. В свете современных представлений о механизме действия гормонов (см. текст) объясните полученные ими приведенные ниже данные. Идентифицируйте компоненты и дайте оценку их результатов.
   а) Добавление адреналина к гомогенату или препарату разрушенных клеток здоровой печени приводило к увеличению активности гликоген-фосфорилазы. Однако если гомогенат предварительно центрифугировали при высокой скорости и затем к прозрачной надосадочной жидкости добавляли адреналин или глюкагон, то увеличения фосфорилазной активности не наблюдалось.
   б) Если фракцию мембран, осажденных при центрифугировании гомогената печени, отделяли и обрабатывали адреналином, то наблюдалось образование нового вещества. Это вещество было выделено и очищено. В отличие от адреналина при добавлении к надосадочной фракции гомогената оно активировало гликоген-фосфорилазу.
   в) Вещество, образующееся в мембранной фракции, было термостабильным, т. е. тепловая обработка не лишала его способности активировать фосфорилазу. (Подсказка: могло ли это иметь место, если бы вещество было белком?) Указанное вещество было идентичным соединению, образующемуся при обработке чистого ATP гидроксидом бария.
5. *Сравнение действия дибутирил-cAMP и cAMP на интактные клетки.* Физиологическое действие адреналина в принципе должно было бы воспроизводиться при добавлении cAMP к клеткам-мишеням. В действительности же добавление cAMP к интактным клеткам-мишеням вызывает всего лишь минимальный физиологический ответ. Почему? Однако ожидаемые физиологические реакции легко получить, если добавить сходное в структурном отношении производное – дибутирил-cAMP.

Объясните, в чем причина различий ответа клеток на эти два соединения. Дибутирил-сAMP широко используется в качестве аналога при исследовании функций сAMP.

6. *Влияние холерного токсина на аденилатциклазу.* Грамотрицательная бактерия *Vibrio cholerae* вырабатывает белок – холерный токсин (мол. масса 90000), вызывающий характерные симптомы холеры, а именно потерю организмом больших количеств воды и ионов Na^+ вследствие продолжительной обессиливающей диареи. Если не восполнять эти потери, то происходит тяжелое обезвоживание организма; без лечения болезнь часто приводит к смерти. Попавший в кишечник человека холерный токсин прочно связывается со специфическими участками на плазматической мембране эпителиальных клеток, выстилающих тонкий кишечник, и тем самым вызывает продолжительную (измеряемую часами и днями) активацию аденилатциклазы. Каким образом холерный токсин влияет на содержание сAMP в клетках кишечника? Основываясь на приведенных выше фактах, что можно сказать о функции сAMP в клетках слизистой кишечника в нормальных условиях? Предложите возможный способ лечения холеры.

7. *Сопоставление метаболизма в мышцах и печени при реакции организма на сигнал «борьба или бегство».* В ситуации «борьба или бегство» выделение адреналина стимулирует распад гликогена в печени, сердце и скелетных мышцах. Продуктом распада гликогена в печени является глюкоза. В скелетных же мышцах гликоген расщепляется в ходе гликолиза.
   а) Почему конечные продукты расщепления гликогена в этих двух тканях оказываются разными?
   б) Какие преимущества для организма, находящегося в критической ситуации, создает наличие этих специфических путей распада гликогена?

8. *Избыточная секреция инсулина: гиперинсулинизм.* При некоторых видах злокачественных опухолей поджелудочной железы происходит избыточный синтез инсулина В-клетками. У больных при этом наблюдаются следующие симптомы: дрожь, слабость и утомляемость, потливость и постоянное чувство голода. Если болезнь затягивается, может происходить нарушение мозговой деятельности. Как влияет избыточная секреция инсулина на обмен углеводов, аминокислот и липидов в печени? Почему развиваются описанные симптомы? Объясните, почему с течением времени это состояние приводит к нарушениям мозговой деятельности.

9. *Термогенез, обусловленный тиреоидными гормонами.* Гормоны щитовидной железы участвуют в регуляции скорости основного обмена (базального метаболизма). При введении избытка тироксина в печень животного возрастают скорость потребления O_2 и выработка тепла (термогенез), но концентрация ATP в ткани остается на уровне нормы. Были предложены разные объяснения термогенного действия тироксина. Одно из них состоит в том, что избыток тиреоидного гормона вызывает разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях. Каким образом, исходя из этого объяснения, можно понять приведенные выше наблюдения? Согласно другому объяснению, термогенез обусловлен повышением скорости использования ATP в стимулируемых тироксином тканях. Считаете ли вы такое объяснение правильным? Почему?

10. *Овариэктомия при лечении рака молочной железы.* Овариэктомия, т. е. удаление яичников, служит одним из средств лечения рака груди. Объясните, какова биохимическая основа такого лечения. В качестве дополнительного способа лечения этого заболевания женщинам вводят мужские половые гормоны, что приводит к торможению физиологических реакций на собственные половые гормоны организма.

11. *Синтез эндорфинов в надпочечниках.* Помимо катехоламинов в мозговом слое надпочечников вырабатываются также некоторые эндорфины, иногда называемые «собственными опиатами мозга». Попытайтесь объяснить, почему эндорфины синтезируются и в мозгу, и в мозговом слое надпочечников?

12. *Функция прогормонов.* Какие преимущества создает синтез гормонов в виде прогормонов и препрогормонов?
13. *Действие аминофиллина.* Больным с приступом астмы наряду с адреналином часто вводят аминофиллин – пуриновое производное, сходное с теофиллином из чая. Какова цель и в чем биохимическая основа применения этих препаратов?
14. *Кальмодулин.* Если кальмодулин, выделенный из мышц моллюсков, добавить к фосфодиэстеразе, выделенной из печени крысы, то это не отразится на скорости медленного гидролитического превращения cAMP в AMP. Однако добавление к этой системе ионов Ca^{2+} приводит к значительному повышению активности фосфодиэстеразы. Какую биохимическую информацию несут эти наблюдения?

ГЛАВА 26

ПИТАНИЕ ЧЕЛОВЕКА

Теперь, после того как мы рассмотрели систему координации метаболических процессов в организме человека, остановимся на том, как этот сложно устроенный организм обеспечивает нормальное протекание метаболических процессов путем усвоения питательных веществ.

Формирование современных научных представлений о питании человека можно считать одним из важнейших достижений биохимии, поскольку они послужили спасению огромного числа человеческих жизней. Еще не так давно такие болезни, как пеллагра, бери-бери и рахит, были широко распространены во многих странах. Сейчас этих болезней уже нет, и мы знаем, как полностью исключить возможность их появления. Вместе с тем хорошо известно, что в настоящее время примерно одной восьмой части населения земного шара пищи не хватает. Парадоксально, что при этом многие в большинстве развитых стран страдают из-за неправильного питания, обусловленного не недостатком пищи, а перееданием и несбалансированностью диеты. Одна из наиболее важных задач биохимии заключается в представлении людям достоверной, научно обоснованной информации о питании, которая рассеяла бы иррациональные народные поверья и объяснила бы порочность извращений и шарлатанства в этой области.

26.1 Полноценный рацион должен содержать пять основных компонентов

В состав полноценного рациона должны входить питательные вещества пяти классов (табл. 26-1), причем вещества каждого из них играют особую роль.

Таблица 26-1. Питательные вещества, необходимые человеку[1]

Источники энергии	*Незаменимые жирные кислоты*
Углеводы	Линолевая кислота
Жиры	Линоленовая кислота
Белки	
Незаменимые аминокислоты	*Неорганические элементы*
Аргинин (для взрослых)	Мышьяк
Гистидин	Кальций
Изолейцин	Хлор
Лейцин	Хром
Лизин	Медь
Метионин	Фтор
Фенилаланин	Иод
Треонин	Железо
Триптофан	Магний
Валин	Марганец
Витамины	Никель
Тиамин	Молибден
Рибофлавин	Фосфор
Никотинамид	Калий
Пиридоксин	Селен
Пантотеновая кислота	Кремний
Фолиевая кислота	Натрий
Биотин	Олово
Витамин B_{12}	Ванадий
Аскорбиновая кислота	Цинк
Витамины A, D, E, K	

[1] Вода, хотя и не является питательным веществом в прямом смысле слова, конечно, также необходима человеку для восполнения потерь, обусловленных потоотделением, дыханием и мочеиспусканием.

а. Углеводы

Углеводы являются наиболее распространенными питательными веществами; в результате их окисления в организме человека образуется основная часть энергии. Они служат также предшественниками в биосинтезе многих компонентов клеток.

б. Жиры

Триацилглицеролы животного и растительного происхождения, так же как и углеводы, играют роль одного из основных источников энергии и, кроме того, служат источником углеродных атомов в биосинтезе холестерола и других стероидов. Триацилглицеролы растительного происхождения являются также источником незаменимых жирных кислот.

в. Белки

Поступающие с пищей белки выполняют три основные функции. Во-первых, они служат источником незаменимых и заменимых аминокислот, которые используются в качестве строительных блоков в ходе биосинтеза белка не только у новорожденных и детей, но и у взрослых, обеспечивая постоянное возобновление и кругооборот белков. Во-вторых, аминокислоты белков служат предшественниками гормонов, порфиринов и многих других биомолекул. И в-третьих, окисление углеродного скелета аминокислот вносит хотя и небольшой, но важный вклад в ежедневный суммарный расход энергии.

Углеводы, жиры и белки являются *основными* или *макропитательными* веществами. Их ежедневное потребление зависит от веса, возраста и пола человека и измеряется сотнями граммов.

г. Витамины

Витамины делятся на две группы: *водорастворимые* и *жирорастворимые*, они являются органическими микропитательными веществами; ежедневная потребность в них не превышает миллиграммов или даже микрограммов. Витамины являются незаменимыми компонентами специфических коферментов или ферментов, участвующих в метаболизме и других специализированных реакциях.

д. Неорганические вещества и микроэлементы

Необходимые для нормального питания неорганические вещества можно разделить на две группы. К первой из них относятся такие элементы, как кальций, фосфор и магний, необходимые организму человека ежедневно в граммовых количествах, а ко второй – железо, иод, цинк, медь и целый ряд других элементов, потребность в которых не превышает миллиграммов или даже микрограммов. Неорганические вещества выполняют различные функции: они используются как структурные компоненты костей и зубов, как электролиты при поддержании водно-солевого баланса крови и тканей, а также как простетические группы ферментов.

Для нормального питания человек должен получать с пищей более 40 различных незаменимых веществ (табл. 26-1). К ним относятся 10 аминокислот, 13 витаминов, 20 или более неорганических элементов (обычно в виде растворимых солей) и одна или несколько полиненасыщенных жирных кислот. К этим веществам следует также добавить клетчатку, состоящую в основном из целлюлозы и других неперевариваемых полимеров клеточных стенок растений. Клетчатка, хотя и не переваривается и, следовательно, не участвует в метаболизме, необходима для правильной перистальтики кишечника.

Отдел пищевых продуктов и питания Национальной Академии наук и Национального исследовательского совета США разработал таблицу ежедневного рациона питания (ЕРП), включающую различные питательные вещества, необходимые для оптимального питания новорожденных, детей, взрослых мужчин и женщин, а также беременных женщин (табл. 26-2). Цифры, представленные

Таблица 26-2. Ежедневный рацион питания, рекомендованный Отделом пищевых продуктов (пересмотрен в 1980 г.)

	Возраст, годы	Вес, кг	Рост, см	Белок, г	Жирорастворимые витамины: Витамин A, мкг[2]	Витамин D_3, мкг	Витамин E, мг	Витамин C, мг
Новорожденные	0,0–0,5	6	60	кг × 2,2	420	10	3	35
	0,5–1,0	9	71	кг × 2,0	400	10	4	35
Дети	1–3	13	90	23	400	10	5	45
	4–6	20	112	30	500	10	6	45
	7–10	28	132	34	700	10	7	45
Мужчины	11–14	45	157	45	1000	10	8	50
	15–18	66	176	56	1000	10	10	60
	19–22	70	177	56	1000	7,5	10	60
	23–50	70	178	56	1000	5	10	60
	51+	70	178	56	1000	5	10	60
Женщины	11–14	46	157	46	800	10	8	50
	15–18	55	163	46	800	10	8	60
	19–22	55	163	44	800	7,5	8	60
	23–50	55	163	44	800	5	8	60
	51+	55	163	44	800	5	8	60
Беременные				+30	+200	+5	+2	+20
Кормящие матери				+20	+400	+5	+3	+40

[1] Указанные ниже рекомендации относятся к здоровым людям, проживающим в США в нормальных условиях. Рацион должен содержать разнообразные общепринятые питательные вещества для того, чтобы обеспечить организм человека питательными веществами, потребность в которых еще до конца не установлена.

в ней, отражают не минимальные ежедневные потребности, а количества, обеспечивающие надежное безопасное существование.

26.2. Организм получает энергию за счет окисления органических макропитательных веществ

Первое требование, предъявляемое к полноценному рациону,– наличие в нем необходимого запаса энергии, высвобождаемой в процессе окисления трех основных макропитательных веществ: углеводов, жиров и белков. Энергию выражают в *килокалориях* (ккал), или *питательных калориях* (сокращенно обозначаемых Кал, с заглавной буквой К); одна килокалория соответствует количеству тепловой энергии, необходимой для нагревания 1,0 кг воды от 15 до 16°С. Напомним, что теми же единицами пользуются при расчете изменений стандартной свободной энергии в ходе метаболических реакций (разд. 14.4).

В табл. 26-3 приведены предложенные Отделом пищевых продуктов и питания ежедневные энергетические потребности для людей разного возраста. Для молодых мужчин студенческого возраста потребность в энергии составляет ~2900 ккал/сут, для женщин того же возраста ~2100 ккал/сут. Новорожденным, детям и людям более старшего возраста требуется обычно меньше энергии. Приведенные величины можно сравнить с количеством энергии, необходимой для поддержания основного обмена, т. е. с количеством энергии, которое нужно организму в состоянии полного покоя, через 12 ч после еды (гл. 25). Для мужчин сту-

и питания Национальной Академии наук и Национального исследовательского совета[1]

Водорастворимые витамины						Неорганические элементы					
Тиамин, мг	Рибофлавин, мг	Никотинамид, мг	Витамин B_6, мг	Фолиевая кислота, мкг	Витамин B_{12}, мкг	Ca, мг	P, мг	Mg, мг	Fe, мг	Zn, мг	I, мкг
0,3	0,4	6	0,3	30	0,5	360	240	50	10	3	40
0,5	0,6	8	0,6	45	1,5	540	360	70	15	5	50
0,7	0,8	9	0,9	100	2,0	800	800	150	15	10	70
0,9	1,0	11	1,3	200	2,5	800	800	200	10	10	90
1,2	1,4	16	1,6	300	3,0	800	800	250	10	10	120
1,4	1,6	18	1,8	400	3,0	1200	1200	350	18	15	150
1,4	1,7	18	2,0	400	3,0	1200	1200	400	18	15	150
1,5	1,7	19	2,2	400	3,0	800	800	350	10	15	150
1,4	1,6	18	2,2	400	3,0	800	800	350	10	15	150
1,2	1,4	16	2,2	400	3,0	800	800	350	10	15	150
1,1	1,3	15	1,8	400	3,0	1200	1200	300	18	15	150
1,1	1,3	14	2,0	400	3,0	1200	1200	300	18	15	150
1,1	1,3	14	2,0	400	3,0	800	800	300	18	15	150
1,0	1,2	13	2,0	400	3,0	800	800	300	18	15	150
1,0	1,2	13	2,0	400	3,0	800	800	300	10	15	150
+0,4	+0,3	+2	+0,6	+400	+1,0	+400	+400	+150	[3]	+5	+25
+0,5	+0,5	+5	+0,5	+100	+1,0	+400	+400	+150	[3]	+10	+50

[2] Для пересчета на ретинольные единицы использовано соотношение: 1 ретинольная единица = 1 мкг ретинола или 6 мкг β-каротина.

[3] Количества железа в обычном рационе недостаточны для беременных женщин и кормящих матерей; для них рекомендуется добавлять 30–60 мг железа.

денческого возраста потребности основного обмена составляют ~ 1800 ккал/сут, для женщин того же возраста ~ 1300 ккал/сут. Очевидно, большие количества энергии, фигурирующие в рекомендациях ежедневного рациона питания, объясняются необходимостью выполнения физической работы. В табл. 26-4 показан расход энергии при различных видах физической работы.

Количество энергии, выделяющейся при окислении углеводов, жиров и белков, можно определить, сжигая образцы известного веса в атмосфере кислорода внутри калориметрической бомбы и определяя общее количество выделившегося тепла (рис. 26-1). При сжигании чистых углеводов выделяется в среднем 4,2 ккал/г, при сжигании жиров ~ 9,5 ккал/г, белков ~ 4,3 ккал/г (табл. 26-5). Калорийность таких пищевых продуктов, как хлеб, картофель, мясо, фрукты и т. д., также можно определить путем их сжигания в калориметрической бомбе. Вместе с тем эту величину можно получить путем расчета, если определить с помощью химического анализа содержание углеводов, жиров и белков в данном образце пищевого продукта и умножить полученные веса на соответствующие коэффициенты калорийности, которые приведены в табл. 26-5. При окислении в организме продукты, способные полностью перевариваться и усваиваться, обеспечивают выделение такого же количества тепла, как и при окислении в калориметре. Идентичность количеств энергии, выделяемой в калориметре и в организме, была подтверждена результатами исследований, проведенных на людях, помещенных в калори-

Таблица 26-3. Суточная потребность в энергии (рекомендации Отдела пищевых продуктов и питания Национальной Академии наук и Национального исследовательского совета, 1980)[1]

	Возраст, годы	Вес, кг	Энергия, ккал
Новорожденные	0,0–0,5	6	650
	0,5–1,0	9	970
Дети	1–3	13	1300
	4–6	20	1700
	7–10	28	2400
Мужчины	11–14	45	2700
	15–18	66	2800
	19–22	70	2900
	23–50	70	2700
	51+	70	2400
Женщины	11–14	46	2200
	15–18	55	2100
	19–22	55	2100
	23–50	55	2000
	51+	55	1800
Беременные			+300
Кормящие			+500

[1] Представлены усредненные значения суточных потребностей в энергии: отклонения от средних значений могут составлять до 15%.

Таблица 26-4. Энергетические потребности при разных видах деятельности

Активность	Мужчины ккал/(кг·ч)	Женщины ккал/(кг·ч)
Очень слабая		
Положение сидя или стоя, рисование, управление автомобилем, работа в лаборатории, машинопись	1,5	1,3
Невысокая		
Ходьба (4–4,5 км/ч), столярные работы, посещение магазинов, обслуживание в ресторанах, стирка, гольф	2,9	2,6
Умеренная		
Быстрая ходьба (5,5–6 км/ч), бег трусцой, прополка и рыхление почвы, езда на велосипеде, теннис, танцы, волейбол	4,3	4,1
Очень высокая		
Подъем в гору с грузом, пилка дров, погрузочные работы, плавание, альпинизм, футбол	8,4	8,0

метр очень большого размера. Поскольку организм человека при любых условиях подчиняется законам термодинамики, не существует никакой «волшебной» диеты, которая могла бы обойти закон сохранения энергии. Калории есть калории.

Рассмотрим теперь характеристики двух из трех основных питательных веществ, обеспечивающих организм энергией: углеводов и жиров.

Рис. 26-1. Принцип устройства калориметрической бомбы, предназначенной для измерения калорийности пищи. Образец пищевого продукта с известным весом поджигается электрическим разрядом в атмосфере с избыточным содержанием кислорода под давлением внутри бомбы, выдерживающей высокое давление. Сгорание пищи вызывает повышение температуры известного количества воды, которой заполнено пространство, окружающее бомбу. Количество выделившегося при сгорании пищи тепла можно легко рассчитать, учитывая, что для нагревания 1 кг воды на 1°C от 14,5 до 15,5°C требуется 1 ккал.

Для измерения количества тепла, выделяемого организмом человека, используют очень большие калориметры с замкнутой камерой, в которой постоянно обеспечивается обмен кислорода и CO_2.

Таблица 26-5. Калорийность основных пищевых продуктов[1)]

	Эквивалент энергии, ккал/г
Углеводы	4,2
Жиры	9,5
Белки	4,3

[1)] Приведенные данные усреднены для различных углеводов, жиров и белков разного химического состава.

а. Углеводы служат основным источником энергии

Сами по себе углеводы не являются незаменимыми компонентами пищи человека, однако, поскольку продукты, богатые углеводами, более доступны и дешевы, чем продукты, содержащие большие количества белков и жиров, именно они составляют основную часть продуктов питания в большинстве стран. Четыре пятых населения земного шара питаются в основном растительной пищей, и на долю углеводов приходится по крайней мере 70%, а иногда и 90% суммарной калорийности такой пищи. В развитых же странах, где население потребляет в сравнительно больших количествах мясные и молочные продукты, на долю углеводов приходится лишь 45% калорийности дневного рациона. В США мужчины в студенческом возрасте потребляют в пищу ежедневно около 400 г углеводов.

В развитых странах более 40% потребляемых углеводов составляют сахароза и другие очищенные сахара, в основном глюкоза и фруктоза, остальная часть приходится на долю крахмала. В менее развитых странах сахарозу употребляют в пищу в очень небольших количествах, в основном в качестве углеводов там используют крахмал. Двести лет назад, когда промышленная революция только начиналась, количество сахара, потребляемое ежедневно одним человеком, составляло в Англии в среднем всего лишь 5 г, сейчас это количество превышает 200 г. Аналогичные изменения произошли и в США (рис. 26-2). Развитие любой страны сопровождается увеличением количества употребляемой в пищу сахарозы. Одна из причин этого состоит в доступности и дешевизне сахарозы по сравнению с другими углёводами в этих странах. В ноябре 1981 г. розничная цена на сахар в США составляла 34 цента за фунт, это количество эквивалентно 1880 ккал, т. е. более 60% дневной потребности в калориях мужчины студенческого возраста. Известно, что для сахарного тростника и свеклы нужна меньшая посевная площадь, чем для эквивалентного по калорийности количества картофеля и злаковых растений. Сахарный тростник является одним из наиболее продуктивных сельскохозяйственных растений. В связи с этим между экономикой сельского хозяйства и правильным питанием

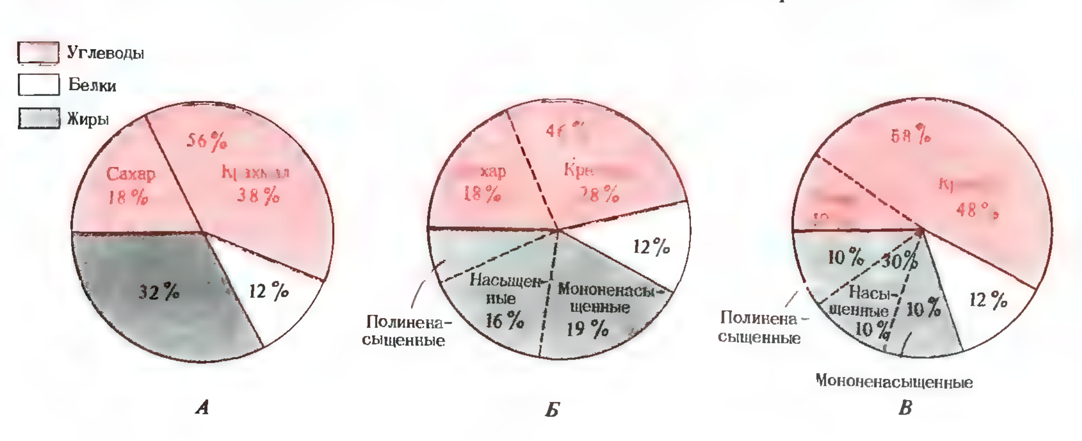


Рис. 26-2. Изменение пищевого рациона в США. *А.* Рацион в 1910 г. *Б.* Современный рацион. *В.* Рацион по сформулированным в последнее время рекомендациям с указанием оптимального соотношения вкладов различных продуктов в суммарную калорийность пищи.

возможен конфликт, поскольку сахароза и другие сахара оказывают неблагоприятное воздействие на зубы (разд. 26.25).

Сладкие продукты часто едят ради удовольствия, некоторые не могут даже обойтись без сладостей. Не исключено, что склонность к сладкому является результатом сохранившегося с младенчества стремления удовлетворить чувство голода (содержание сахара в женском молоке в два раза выше, чем в коровьем). Многие виды животных также предпочитают сладкое; вместе с тем некоторые виды индифферентны к нему или даже избегают сладкого.

б. Все более широкое применение находят некалорийные заменители сахаров

Искусственный заменитель сахара – *сахарин* (рис. 26-3) – в течение многих лет использовали для снижения калорийности пищи больных, страдающих диабетом и ожирением, без явных вредных последствий для здоровья пациентов. Однако в 1969 г. было установлено, что при скармливании крысам в очень больших дозах он может оказывать канцерогенное действие. После этого вопрос об использовании сахарина для приготовления «диетических» напитков и продуктов стал предметом дискуссий. Однако поскольку польза сахарина как заменителя сахара очевидна, а риск, связанный с его канцерогенностью для людей, сравнительно невелик, его продолжают использовать для приготовления «диетических» напитков. Другой синтетический некалорийный заменитель сахара – *цикламат натрия* (рис. 26-3) – из-за более сильно выраженных канцерогенных свойств, выявленных на животных, был запрещен для приготовления пищевых продуктов.

В настоящее время прилагаются усилия для поиска новых, нетоксичных заменителей сахара. Одно из детально исследованных в этом направлении веществ – *аспартам* (рис. 26-3) – метиловый эфир дипептида аспартилфенилаланина. Поскольку в состав его молекулы входят два аминокислотных остатка, встречающихся в обычных белках, полагают, что оно не должно быть токсичным. Управление по использованию продуктов питания и лекарственных веществ разрешило использовать аспартам для приготовления некоторых имеющихся в продаже пищевых продуктов. Еще одним кандидатом на роль заменителя сахара является *монелин*, белок (мол. масса 11 000), добываемый из африканских плодов-сюрпризов (African serendipity berry). Сладость этого белка в расчете на единицу веса в 2000 раз превышает сладость сахарозы (табл. 26-6). Сладкий вкус монелина обусловлен специфической особенностью пространственной структуры его полипептидной цепи. При нагревании

Сахарин

Цикламат натрия

Аспартам (метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина)

Рис. 26-3. Некалорийные заменители сахаров. Оценка их относительной сладости приведена в табл. 26-6. Некоторым людям сахарин кажется горьким на вкус, что может быть обусловлено генетическими особенностями во вкусовых восприятиях.

или других видах денатурации монелин утрачивает сладость.

Таблица 26-6. Относительная сладость некоторых сахаров и некалорийных заменителей сахаров (по сравнению с сахарозой)

Сахароза	1,0	Сахарин	400
Глюкоза	0,5	Цикламат натрия	30
Фруктоза	1,7	Аспартам	180
Лактоза	0,2	Монелин	2000

в. Жиры обеспечивают организм калориями и незаменимыми жирными кислотами

На долю триацилглицеролов приходится около 98% общего количества липидов в пище; остальные 2% составляют фосфолипиды, холестерол и его эфиры. При комнатной температуре триацилглицеролы животного происхождения, в состав которых входит относительно много насыщенных жирных кислот, обычно имеют твердую консистенцию. Что же касается триацилглицеролов растительного происхождения, в состав которых входит сравнительно большое количество ненасыщенных жирных кислот, то они при комнатной температуре обычно жидкие. При окислении триацилглицеролов обоих типов количество энергии, выделяемой в расчете на 1 единицу веса, более чем в 2 раза превышает количество энергии, выделяемой при окислении углеводов (табл. 26-5). Поскольку жиры задерживаются и перевариваются в желудке обычно медленнее, чем углеводы, они лучше способствуют насыщению, чем углеводы.

Экспериментальные животные не способны синтезировать *линолевую* и *линоленовую кислоты* (разд. 21.6), поэтому они должны получать их с пищей. Люди, как правило, не испытывают недостатка в незаменимых жирных кислотах, так как эти кислоты в больших количествах содержатся во многих продуктах растительного происхождения, в рыбе и птице. В мясных и молочных продуктах их содержание намного ниже. Линолевая кислота (рис. 26-4) необходима организму в связи с тем, что она служит предшественником *арахидоновой кислоты* (разд. 21.6), которая в свою очередь играет роль предшественника *простагландинов* и *тромбоксанов* (разд. 25.23).

В рационе жителей развитых стран наряду с большим количеством очищенных сахаров значительное место занимают жиры, особенно жиры животного происхождения (рис. 26-2). Предполагают, что именно с этим связано увеличение частоты атеросклероза, ишемической болезни сердца и нарушений мозгового кровообращения у населения высокоразвитых стран. При атеросклерозе происходит аномальное отложение липидов в интиме артерий, что приводит к огра-

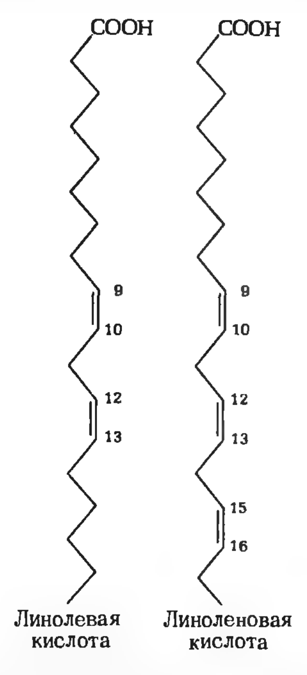


Рис. 26-4. Незаменимые жирные кислоты. У млекопитающих нет ферментов, способных катализировать образование двойной связи в положении Δ^9, поэтому они должны получать линолевую и линоленовую кислоты с растительной пищей. Эти кислоты необходимы как предшественники для образования в тканях других полиненасыщенных жирных кислот, в частности арахидоновой и других 20-атомных полиненасыщенных жирных кислот, которые в свою очередь служат предшественниками простагландинов. У маленьких детей недостаток незаменимых жирных кислот может приводить к развитию экземы.

ничению кровотока. В тех случаях, когда липидные отложения закупоривают сосуды сердца или мозга, развивается соответственно ишемическая болезнь сердца или инсульт; ткань миокарда или мозга гибнет из-за недостатка в них кислорода (рис. 26-5).

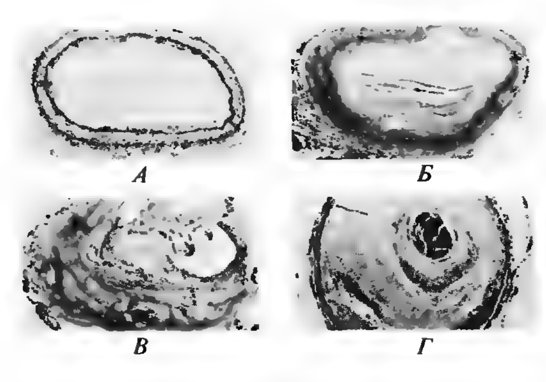


Рис. 26-5. Атеросклероз – постепенное уменьшение просвета артерии небольшого диаметра из-за роста липидных отложений. На фотографиях показаны поперечные срезы: нормальной артерии (*А*), артерии, внутри которой формируются липидные отложения (*Б*), артерии с уплотненными отложениями (*В*) и артерии, просвет которой полностью закупорен кровяным сгустком (*Г*).

В животных жирах есть два компонента, которые могут способствовать возникновению атеросклероза,– *насыщенные жирные кислоты* и *холестерол*, однако некоторые ученые оспаривают статистические данные, подтверждающие эту точку зрения. Большинство животных жиров, в частности жиры мяса, молока и яиц, содержат относительно много насыщенных и мало ненасыщенных жирных кислот (табл. 26-7), исключение составляют куриный и рыбий жир. Растительные жиры, напротив, очень богаты полиненасыщенными жирными кислотами. По калорийности ценность насыщенных и ненасыщенных жиров примерно одинакова, однако обильное потребление насыщенных животных жиров наряду с незначительным количеством полиненасыщенных жиров может приводить у многих (но не у всех) людей к уменьшению концентрации в крови *липопротеинов высокой плотности* и к увеличению концентрации *липопротеинов низкой плотности* (разд. 12.8), а также общего холестерола. Существует корреляция между частотой ишемической болезни сердца, с одной стороны, и низкой концентрацией липопротеинов высокой плотности и высокой концентрацией липопротеинов низкой плотности, а также общего содержания холестерола – с другой. Поэтому рекомендуется содержащиеся в мясе, яйцах, молоке, сливочном масле и сыре жиры животного происхождения частично заменять растительными жирами, богатыми полиненасыщенными жирными кислотами. Полезно также использовать вместо масла маргарин, поскольку его получают частичным гидрированием растительных масел (разд. 12.2). Процесс гидрирования, в результате которого увеличивается степень насыщения этих масел, можно контролировать. Например, существует «мягкий» маргарин, обладающий более высокой питательной ценностью, по сравнению с «твердым» маргарином, так как он содержит больше полиненасыщенных жиров (табл. 26-7). Что касается холестерола, то у некоторых людей он

Таблица 26-7. Состав жирных кислот в типичных животных и растительных жирах

	Процент общего количества жирных кислот		
	насыщенные	мононенасыщенные	полиненасыщенные
Сливочное масло	60	36	4
Свиной жир	59	39	2
Говяжий жир	53	44	2
Куриный жир	39	44	21
Кукурузное масло	15	31	53
Соевое масло	14	24	53
Мягкий маргарин	23	22	52

Рис. 26-6. Холестерол. В эфирах холестерола гидроксильная группа (выделёна красным цветом) этерифицирована длинноцепочечными жирными кислотами.

влияет на соотношение между липопротеинами крови. В значительных количествах он содержится в продуктах животного происхождения, особенно много его в яичном желтке, сливочном масле и мясе, тогда как в растительных продуктах его нет. В типичном для жителей США рационе ежедневное потребление холестерола составляет 600–800 мг, в основном за счет яичных желтков. Холестерол синтезируется из ацетил-CoA (разд. 21.16) и может выводиться только путем превращения в соли желчных кислот, которые в свою очередь выводятся из кишечника сравнительно медленно. Если в пище много холестерола, то его содержание в крови увеличивается, но при этом его синтез ингибируется. Существует хорошо сбалансированное равновесие между количеством холестерола, всасываемого в кишечнике, синтезируемого в тканях и выводимого из организма. Больным ишемической болезнью сердца часто рекомендуют диету с низким содержанием холестерола, в которой насыщенные жиры частично заменены на полиненасыщенные. Однако в связи с тем, что развитие ишемической болезни сердца зависит и от генетических факторов, а также от курения и гипертонии, диета с пониженным содержанием животных жиров и холестерола помогает далеко не всем больным. Атеросклероз, по-видимому, имеет сложное происхождение, и подверженность ему у разных людей различна. Бесспорно, что на развитие этой болезни влияет состав пищи, однако лучше всего, вероятно, родиться с хорошими генами.

26.3. Этанол также служит источником энергии

В экономически развитых странах употребление спиртных напитков в последние 25 лет возросло столь значительно, что этанол стал вносить существенный вклад в суммарную калорийность пищи: даже у не страдающих алкоголизмом взрослых людей вклад спирта в общую калорийность пищи может достигать 12% (табл. 26-8). Этанол обладает высоким запасом энергии – при окислении 1 г этого спирта выделяется 7 ккал энергии; данная величина лежит между калорийностями углеводов и жиров. Более того, выделяемая при окислении этанола в организме энергия может по хорошо изученным метаболическим путям запасаться в виде ATP. В печени под воздействием цитозольного фермента *алкогольдегидрогеназы* этанол окисляется до ацетальдегида; акцептором ионов водорода в этой реакции служит NAD^+:

$$\underset{\text{Этанол}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Ацетальдегид}}{CH_3-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-H} + NADH + H$$

Таблица 26-8. Потребление спиртных напитков в США за год в пересчете на душу населения[1] (1978 г.)

Напиток	Объем, галлон (1 галлон = = 3,8 л)	Этанол, % (по объему)	Эквивалент энергии, ккал
Крепкие напитки	2,9	50	33 000
Пиво	23,4	5	25 000
Вино	1,9	12	4 900
В сумме			62 900

[1] Суточное потребление этанола в виде разных напитков в расчете на душу населения соответствует энергии 240 ккал. Поскольку суммарное потребление энергии в виде продуктов питания составляет около 3000 ккал/сут, на долю этанола приходится 8%. В некоторых европейских странах, в частности во Франции, уровень потребления алкоголя еще выше. У часто пьющих людей и алкоголиков на долю этанола может приходиться больше половины калорийности потребляемых ими продуктов.

Ацетальдегид далее под воздействием NAD-зависимого митохондриального фермента альдегид-дегидрогеназы окисляется до ацетата:

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-H + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons CH_3COOH + NADH + H^+$$

В результате этих реакций образуются две молекулы NADH, которые служат донорами восстановительных эквивалентов для дыхательной цепи митохондрий. В ходе последующего переноса электронов к кислороду из ADP и P образуется 2(3) = 6 молекул ATP. Образовавшийся из этанола ацетат далее активируется в печени короткоцепочечной ацил-CoA-синтетазой, в результате чего образуется ацетил-CoA.

$$CH_3COOH + CoA\text{-}SH + ATP \rightleftharpoons CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-S-CoA + AMP + PP_i$$

Образовавшийся ацетил-CoA далее может окисляться в цикле лимонной кислоты. Часто говорят, что этанол содержит «холостые калории». Этот термин не точен, так как означает, что калории этанола не усваиваются организмом. Однако на самом деле этот термин лишь отражает тот факт, что крепкие напитки, вино и пиво практически не содержат витаминов и минеральных веществ.

Наряду с неблагоприятными социальными и экономическими последствиями алкоголизма использование спирта в качестве пищевого продукта и источника энергии имеет ряд недостатков с биохимической точки зрения. Во-первых, избыточные по сравнению с дневной нормой калории, поступающие в организм с этанолом, превращаются через ацетил-CoA только в жиры, поскольку в организме человека этанол не может превратиться в глюкозу или гликоген. Во-вторых, у многих людей большие дозы этанола вызывают гипогликемию, так как он блокирует синтез глюкозы из лактата и аминокислот. И, наконец, в-третьих, этанол – очень дорогой источник калорий. В США количество пива в упаковке из шести банок, соответствующее 1130 ккал, стоит приблизительно в 20 раз дороже, чем содержащие такое же количество калорий 300 г сахара.

26.4. Ожирение возникает в результате потребления излишне калорийной пищи

Ожирение, увеличивающее вероятность сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонии и диабета, возникает в результате того, что количество потребляемых организмом калорий превышает его потребность. Ожирение обычно развивается в детстве или старости, и чем дольше оно имеет место, тем труднее от него избавиться. Наилучший путь борьбы с ожирением – формирование уже в молодом возрасте разумных диетологических и физкультурных привычек. Некоторые люди более других склонны превращать источники калорий в жиры, вероятно из-за пониженной способности к теплообразованию в результате холостого цикла (разд. 20.12) или из-за термогенного действия бурого жира (разд. 17.17). Важно понимать, что ожирение возникает в результате потребления избыточных количеств не только жиров как таковых, но при избыточном поступлении калорий в любом виде, будь то жиры, углеводы или белки.

1 кг жира человека эквивалентен примерно 8750 ккал. Сопоставляя этот факт с данными, приведенными в табл. 26-3, можно оценить степень переедания, приводящую к определенному накоплению лишнего веса. Накопление лишних 10 кг жира у 28-летнего мужчины соответствует избыточному потреблению 10·8750 = 87 500 ккал. Такое накопление жира может быть следствием ежедневного потребления лишних 150 кал (что составляет лишь 5,6% средней ежедневной потребности – 2700 ккал) в течение 583 дней, т.е. чуть больше 18 мес. Обычно, однако, избыточный вес накапливается в течение нескольких лет. Так, в нашем примере, если накопление 10 лишних килограммов жира происходило в течение 5 лет, то это могло быть следствием ежедневного потребления избыточных 48 кал, т.е. всего лишь на 1,8% больше, чем

необходимо. Эти данные показывают, насколько зависит вес тела даже от незначительного увеличения (уменьшения) количества калорий, ежедневно потребляемых в течение длительных периодов времени.

Рассмотрим теперь, сколько времени должно понадобиться для уменьшения лишнего веса путем снижения числа потребляемых калорий. Чтобы потерять 10 кг жира, человек должен потреблять в тёчение 42 нед не более 2400 ккал/день, или в течение 21 нед не более 2100 ккал/день, или в течение 14 нед 1800 ккал/день. Для того чтобы потерять вес еще быстрее, требуется столь сильно сократить ежедневный рацион, что это может привести к снижению работоспособности организма. Быстрая потеря десяти лишних килограммов жира требует, следовательно, почти героических усилий. В табл. 26-9 показана калорийность некоторых пищевых продуктов, которые часто потребляют в избыточных количествах. Приведенные в этой таблице данные позволяют установить, потребление каких продуктов и в какой степени надо ежедневно сокращать, чтобы достичь нужной скорости потери веса. Данные же, приведенные в табл. 26-4, показывают, какие физические упражнения необходимо проводить для потери определенного веса. Лучший способ поддерживать постоянный вес тела состоит в сочетании регулярных физических упражнений с регулярным правильным питанием. Существенно легче предотвратить накопление лишнего веса, чем потом избавляться от него.

«Ударные» диеты создают лишь иллюзию потери веса, так как большая часть этих потерь обусловлена выведением воды из организма. В долговременном аспекте они обычно оказываются неэффективными, поскольку практически во всех случаях после таких диет люди вновь возвращаются к диете с избыточным количеством калорий. «Стандартные» диеты, четко оговаривающие тип и количество ежедневно потребляемой пищи, удобны тем, что не требуют расчетов калорийности пищи по таблицам, однако они слишком жестко ограничивают выбор продуктов в течение длительного времени, что может привести к недостатку некоторых витаминов и минеральных веществ.

Таблица 26-9. Список, позволяющий контролировать калорийность некоторых богатых энергией пищевых продуктов

Пищевой продукт	Порция	ккал
Бекон	Два кусочка	96
Пицца	Кусок размером 12 см	184
Печеный картофель	1 шт.	93
Картофель по-французски	10 средних ломтиков	156
Картофельные ломтики	10 (средних)	114
Рис	1 чашка	210
Спагетти	1 чашка	178
Белый хлеб	1 кусок	62
Масло	1 кружок	50
Майонез	1 стол. ложка	93
Ореховое масло	1 стол. ложка	87
Сладкий рулет	1 кусок	174
Шоколадный пирог, глазированный	1 кусок толщиной 2,5 см	407
Кекс	1 шт.	204
Пончик	1 шт.	125
Домашнее печенье	3 шт.	240
Яблочный пирог	$^{1}/_{7}$ часть	343
Молочный шоколад	30 г	147
Сахар	1 стол. ложка	46
Мороженое	1 стаканчик	147
Орехи	30 г	160
Пиво	350 г	188
Безалкогольные напитки	350 г	90

26.5. Белки необходимы как источники аминокислот

Белки сами по себе не являются незаменимыми компонентами рациона человека. Для нормального питания необходимы лишь содержащиеся в них незаменимые аминокислоты (табл. 26-10). Для взрослых людей незаменимыми являются девять аминокислот, суточная потребность в которых варьирует от 0,5 г (для триптофана) до 2 г (для лейцина, фенил-

Таблица 26-10. Суточная потребность в незаменимых аминокислотах (для молодых мужчин)

Аминокислота	г	Аминокислота	г
Аргинин	0[1]	Метионин	2,02
Гистидин	—[2]	Фенилаланин	2,02
Изолейцин	1,30	Треонин	0,91
Лейцин	2,02	Триптофан	0,46
Лизин	1,50	Валин	1,50

[1] Необходим только новорожденным и растущим детям.

[2] Незаменим, но точная потребность пока не установлена.

аланина). Новорожденным и растущим детям необходима еще одна, десятая, аминокислота – *аргинин.* У взрослых аргинин образуется в достаточных количествах в печени в процессе синтеза мочевины (разд. 19.16), однако детям для одновременного синтеза мочевины и необходимых организму белков образующегося таким путем аргинина не хватает.

Ежедневно молодым мужчинам рекомендуется потреблять 54 г белков, однако при этом подразумевается, что в пищу входят самые разнообразные белки растительного и животного происхождения. Из приведенных в табл. 26-10 данных следует, что по крайней мере 12 из 54 г белка должны приходиться на долю незаменимых аминокислот, а остальные 42 г – на долю заменимых. Питательная *ценность* или *качество* данного белка зависит от двух факторов: (1) от его аминокислотного состава и (2) от его усвояемости. Белки значительно различаются по аминокислотному составу (разд. 6.3). Некоторые из них содержат полный набор незаменимых аминокислот в оптимальных соотношениях; другие могут не содержать одной или нескольких незаменимых аминокислот. Растительные белки, особенно белки пшеницы и других злаковых, не могут полностью перевариваться, так как белковая часть зерен защищена состоящей из целлюлозы и других полисахаридов оболочкой, которая не гидролизуется пищеварительными ферментами. Поскольку в кишечнике могут усваиваться только свободные аминокислоты, далеко не все аминокислоты продуктов растительного происхождения в действительности биологически доступны для организма человека.

Питательные свойства белков можно оценить с помощью двух характеристик – *химической ценности* и *биологической ценности.* В первом случае после полного гидролиза определяют аминокислотный состав белка и сравнивают его со стандартом – белком, полученным из молока и яиц. При этом определяют потенциальную химическую ценность белка. Мерой *биологической ценности* белка служит величина, обратно пропорциональная количеству данного белкового продукта, которое необходимо для поддержания *азотистого баланса* у взрослого человека или экспериментального животного, т. е. состояния, при котором количество поступающего в организм азота точно соответствует его количеству, выводимому с мочой и калом. Если в данном белке есть все незаменимые аминокислоты в необходимых пропорциях и все они могут всасываться в кишечнике, то биологическая ценность такого белка условно принимается равной 100. Для полностью перевариваемых белков с неполным содержанием аминокислот или с полным содержанием аминокислот, но не полностью перевариваемых это значение будет заведомо ниже. В соответствии с этим критерием биологическая ценность белка, в котором отсутствует хотя бы одна незаменимая аминокислота, будет равна нулю. Если белок характеризуется низкой биологической ценностью, он должен присутствовать в пище в очень больших количествах, чтобы обеспечить потребности организма в незаменимой аминокислоте, содержание которой в таком белке минимально. Остальные аминокислоты будут поступать в организм при этом в количествах, превышающих его потребности. Лишние аминокислоты будут подвергаться в печени дезаминированию и превращаться в гликоген или жир либо просто сгорать в качестве топлива.

Табл. 26-11 иллюстрирует качество некоторых пищевых белков. Животные белки, содержащиеся, например, в моло-

Таблица 26-11. Качество белков некоторых пищевых продуктов

Продукт	Химическая ценность	Биологическая ценность
Женское молоко	100	95
Говядина	98	93
Яйцо	100	87
Коровье молоко	95	81
Кукуруза	49	36
Очищенный рис	67	63
Белый хлеб	47	30

ке, говядине, яйцах, отличаются хорошими химическими характеристиками и высокой биологической ценностью. Вместе с тем белки, содержащиеся в кукурузе и цельном белом хлебе, обладают низкой химической ценностью, поскольку в них отсутствует одна или несколько незаменимых аминокислот. Биологическая ценность этих белков еще ниже, так как они не полностью перевариваются. Чтобы обеспечить организм минимально необходимым количеством всех нужных аминокислот, животные должны ежедневно потреблять растительные белки в сравнительно больших количествах. Это вовсе не означает, что белый хлеб плох как пищевой продукт; просто если питаться только одним белым хлебом, то его придется съедать ежедневно очень много для того, чтобы удовлетворить хотя бы минимальные потребности организма в незаменимых аминокислотах. Так, например, в одном куске белого хлеба содержится менее 2 г белка; если при этом учесть, что по качеству этот белок менее чем на треть соответствует идеальному, то 20-летнему мужчине для удовлетворения ежедневной потребности в белке, которая составляет около 56 г, нужно съедать каждый день более 70 кусков белого хлеба. И вообще при обычных способах приготовления пищи растительные белки в пересчете на 1 г сухого веса содержат меньше белка, чем животные.

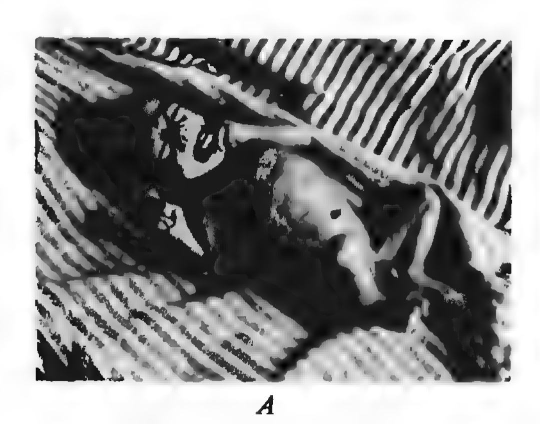
Для нормального синтеза белка в организме человека все незаменимые аминокислоты должны быть доступны одновременно. Если крыс кормить синтетической пищей, содержащей все незаменимые аминокислоты, кроме одной, а затем через 3 ч дать им недостающую аминокислоту, то крысы все равно не будут расти, поскольку аминокислоты не могут запасаться.

26.6. Некоторые растительные белки пищи могут быть взаимодополняющими

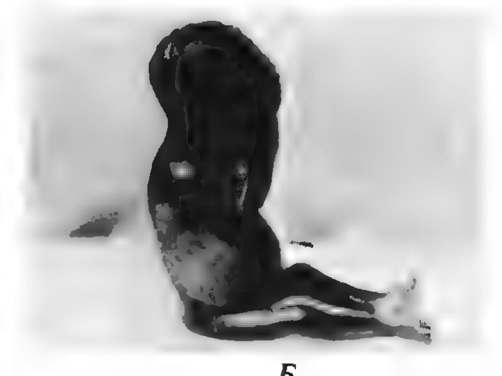
Хотя растительные белки в целом по питательной ценности уступают животным белкам, тем не менее при определенной комбинации растительных белков организм обеспечивается полной и сбалансированной смесью аминокислот. Так, например, белки кукурузы содержат мало лизина, но достаточное количество триптофана, тогда как белки бобов богаты лизином, но содержат мало триптофана. В отдельности ни один из этих белков нельзя считать «хорошим». Однако смесь бобов и кукурузы содержит необходимое человеку количество незаменимых аминокислот. Такая смесь, известная под названием *суккоташ* (блюдо из кукурузы и бобов), была интуитивно «открыта» индейцами Нового Света. Раздельное использование только бобов на завтрак и только кукурузы на обед неизбежно нарушит полезную комбинацию этих растительных белков. Жители Востока также научились комбинировать определенные растительные продукты для получения полной с точки зрения питательной ценности смеси аминокислот; примером такой комбинации может служить сочетание риса с соевыми бобами. В Центральной и Южной Америке, где недостаток белков в пище был обычным явлением, международный комитет по проблемам питания включил в рацион полноценную питательную смесь, известную под названием “Incaparina”, содержащую сравнительно дешевые растительные белки, главным образом кукурузы, сорго и хлопковых растений. Каждый из компонентов этой смеси сам по себе обладает низкой питательной ценностью, однако в совокупности они образуют белковую смесь, эквивалентную по питательной ценности белкам молока.

26.7. Истощение и квашиоркор – проблемы всемирного здравоохранения

В ряде стран, расположенных в основном в Южном полушарии, все больше возрастает несоответствие между скоростью роста численности населения и производством продуктов питания. Всегда на Земле есть голодающие люди, число которых неизбежно возрастает в неурожайные и военные годы. По приблизительным оценкам, число людей, находящихся на грани голодания, составляет 500 млн., а около 12000 человек ежедневно умирают от голода. Только в одной Индии от недоедания ежегодно умирает около 1 млн. детей. Недостаточное питание детей чаще всего приводит к двум, часто протекающим совместно, заболеваниям, а именно – истощению и квашиоркору (рис. 26-7).



А



Б

Рис. 26-7. *А*. Ребенок из Индонезии с истощением, обусловленным хронической недостаточностью калорийности пищи. Обычно истощение осложняется дефицитом ряда витаминов и минеральных веществ. *Б*. Ребенок из Анголы, больной квашиоркором. Недостаток белков в питании приводит к распуханию и отеку ряда тканей из-за нарушения синтеза сывороточного альбумина, необходимого для поддержания нормального водно-солевого обмена.

Истощение вызывается хроническим недостатком калорий в пище для детей. Это заболевание распространено в странах с нехваткой продуктов питания. Оно развивается у грудных детей после перехода от кормления их грудным молоком на искусственную пищу, которая представляет собой обычно водянистую кашицу, приготовленную из злаковых и других растений, и содержащую, как правило, мало как калорий, так и белков. Вместе с тем хорошо известно, что именно в этот период развития и роста ребенка калории и белки особенно необходимы. Для состояния истощения характерна задержка роста, резко выраженная атрофия мышечной системы, общая слабость и анемия; это состояние осложняется обычно недостатком витаминов и минеральных веществ. Недостаточное поступление калорий в раннем детстве, даже если оно потом компенсируется нормальной диетой, приводит к задержке нормального роста и развития организма. Смертность детей из-за недостаточной калорийности пищи в странах с нехваткой продуктов питания очень велика – более половины детей не доживает до 5-летнего возраста. Истощение – это одно из проявлений большого числа заболеваний, обусловленных общим недостатком продуктов питания, в частности белка. В странах, где люди голодают, в их рационе как правило, не хватает одновременно и калорий, и белков, но степень их недостаточности может быть разной; сочетание недостаточности обоих факторов называют *нарушением белково-калорийного питания*.

Во многих странах для нормального питания людям не хватает белков животного происхождения. Поскольку растительные продукты содержат белок

в меньших количествах и «худшего» качества, чем продукты животного происхождения, в странах с особенно быстрым ростом населения возникает существенный недостаток «хороших» белков. Постоянная нехватка белка в пище вызывает у детей заболевание *квашиоркор*, название которого произошло от африканского слова, в переводе означающего «отнимание от груди». В слаборазвитых странах детей кормят грудным молоком сравнительно долго, однако, когда их отнимают от груди (причиной чего служит обычно следующий ребенок), они начинают получать пищу с недостаточным количеством белка. Рост детей, не получающих достаточного количества белка, замедляется, у них развивается анемия, их ткани из-за недостаточного количества белка в плазме крови раздуваются и становятся отечными, вследствие чего нарушается нормальное распределение воды между кровью и тканями. Более того, дегенеративные процессы развиваются также в печени, почках и в поджелудочной железе. Смертность среди детей, страдающих квашиоркором, очень велика. Даже в тех случаях, когда они выживают, длительная недостаточность белка приводит к необратимым нарушениям их физиологических функций. Еще более важно то, что недостаток белка в раннем возрасте приводит к нарушению умственных способностей и способности детей к обучению. Особенно тяжелые случаи этой болезни отмечаются в ситуациях, когда недостаток белка имеет место на протяжении двух или трех поколений. Квашиоркор впервые был диагностирован в Африке, однако в дальнейшем оказалось, что это заболевание встречается во всех странах, где в продуктах питания не хватает полноценных белков.

26.8. Недостаточность некоторых витаминов может оказаться опасной для жизни

Рассмотрим теперь вопрос о роли витаминов в питании. В гл. 10 мы уже рассматривали строение витаминов и их коферментные функции. В этом разделе мы остановимся на потребностях человека в витаминах и последствиях, к которым приводит их недостаточность.

Сегодня мы можем с уверенностью сказать, что нам известны все витамины, которые необходимы для нормального питания человека и крыс. В зависимости от того, насколько вредно отражается недостаточность того или иного витамина на здоровье человека, их можно разделить на два класса (табл. 26-12). Недостаточность тиамина, ниацина, рибофлавина, фолиевой и аскорбиновой кислот существенно сказывается на здоровье людей и является весьма актуальной проблемой во многих странах. С частичной недостаточностью этих витаминов сравнительно часто приходится сталкиваться даже в высокоразвитых странах. Что же касается пантотеновой кислоты, пиридоксина, биотина, витамина B_{12} и витаминов A, D, E и K, то недостаточность в этих витаминах у жителей развитых стран встречается крайне редко.

Таблица 26-12. Витамины, необходимые человеку

Недостаточность встречается сравнительно часто	
Тиамин	Рибофлавин
Ниацин	Фолиевая кислота
Аскорбиновая кислота	
Недостаточность в США встречается сравнительно редко	
Пантотеновая кислота	Витамин A
Пиридоксин	Витамин D
Биотин	Витамин E
Витамин B_{12}	Витамин K

Индивидуальные потребности людей в определенных витаминах могут варьировать в значительных пределах в зависимости от типа рациона, активности микроорганизмов желудочно-кишечного тракта, а также генетических факторов. Например, потребность в никотинамиде сильно зависит от белкового состава пищи и, в частности, от наличия в ней триптофана, который может превращаться в организме в никотинамид, а потребность в пиридоксине возрастает с увели-

чением содержания белка в пище. Вместе с тем такие витамины, как биотин, пантотеновая кислота и витамин B_{12}, синтезируются бактериями кишечника в количествах, достаточных для того, чтобы удовлетворить нормальные потребности человека. Недостаток этих витаминов может ощущаться лишь при очень необычной диете.

Большинство водорастворимых витаминов должны регулярно поступать с пищей, поскольку они сравнительно быстро выводятся из организма или разрушаются в ходе обычных ферментативных реакций. При потреблении чрезмерных количеств водорастворимых витаминов в виде поливитаминных таблеток их избыток, превышающий ежедневные потребности, просто выводится из организма, так как большинство водорастворимых витаминов не могут запасаться. В то же время избыточное потребление жирорастворимых витаминов (A и D) может оказаться токсичным.

Тиамин

Коферментная форма: тиаминпирофосфат

Функция: кофермент пируватдегидрогеназы, α-кетоглутаратдегидрогеназы и транскетолазы

Рекомендуемая ежедневная доза (для 21-летнего мужчины): 1,5 мг

Синдром недостаточности: бери-бери

Рис. 26-8. Структура, функции и ежедневная доза тиамина (витамина B_1). См. также рис. 10-2.

26.9. Недостаточность тиамина все еще остается проблемой питания

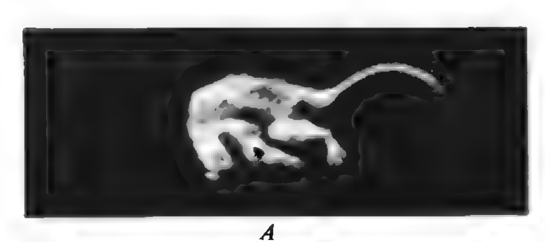
При недостаточности тиамина (рис. 26-8) наблюдается неврологическое заболевание «бери-бери» («я не могу»), которое было распространено в XIX и начале XX в. в восточных странах, где люди употребляют в пищу много риса (разд. 10.4). Это заболевание было неизвестно до тех пор, пока в начале XIX в. не появились машины, снимающие шелуху с риса. Довольно долго бери-бери считали инфекционным заболеванием. Первое предположение о том, что эта болезнь обусловлена нарушением питания, высказал датский врач К. Эйкман (C. Eijkman), который работал в районе современной Индонезии. В 1897 г. он опубликовал разультаты исследований, в которых было показано, что при кормлении цыплят очищенным (белым) рисом, приготовленным таким же образом, как и для кулинарных блюд, у них развивается заболевание нервной системы, напоминающее болезнь бери-бери у людей. Если же цыплят кормить неочищенным рисом или давать им шелуху и очистки от риса, то болезнь не возникает. Это исследование натолкнуло врачей японского флота на мысль кормить моряков, страдающих бери-бери, неочищенным рисом. Результаты превзошли все ожидания. Сейчас мы знаем, что в шелухе риса, которую удаляют в ходе очистки, содержится основное количество тиамина. Тяжелые случаи бери-бери в настоящее время не представляют такой сложности для лечения, как раньше, однако в странах Азии, в Индонезии и на Филиппинах, где люди употребляют в пищу большие количества риса, а также в странах Африки, где потребление очищенной пшеничной муки возрастает с каждым годом, болезнь бери-бери все еще остается проблемой.

Для бери-бери характерны мышечная слабость, истощение, плохая координация, периферический неврит, спутанность сознания, апатия, снижение частоты сердечных сокращений и увеличение размеров сердца. Болезнь может также сопровождаться опуханием или отеком конечностей. Наиболее частой причиной смерти служит сердечная недостаточность. Особенно тяжело бери-бери протекает у грудных детей, матери которых не получают достаточного количества тиамина. При бери-бери в крови резко возрастает концентрация пирувата, что подтверждает участие тиаминпирофосфата в качестве кофермента в пируватдегидрогеназном комплексе (разд. 16.2). Введение

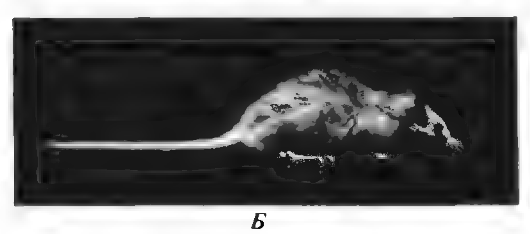
тиамина животным или детям, больным бери-бери, приводит к практически полному их выздоровлению в течение нескольких часов (рис. 26-9).

Некоторые продукты питания особенно богаты тиамином. Богатыми источниками тиамина служат постное мясо, бобы, неочищенные зерна и рыба. Несмотря на то что потребность организма человека в тиамине известна уже давно, многие американцы не получают с пищей этот витамин в достаточном количестве. Взрослым людям рекомендуется ежедневно потреблять от 1,0 до 1,5 мг тиамина (рис. 26-8, табл. 26-2), тогда как большинство американцев потребляют менее 1 мг в день. Именно по этой причине в белый хлеб, содержание тиамина в котором очень мало, обычно специально добавляют тиамин. Содержание тиамина в таких продуктах, как очищенная белая мука, макаронные изделия, спагетти и приготовленные на соде крекеры, также очень невелико, поэтому их тоже часто обогащают тиамином.

Поскольку алкоголики получают основную массу калорий со спиртными напитками, в которых нет тиамина, у них может возникать недостаточность этого витамина. Характерная для алкоголиков недостаточность тиамина, получившая название синдрома Вернике–Корсакова, сопровождается расстройствами функций нервной системы, психозами, потерей памяти. Причиной этого необратимого и обычно требующего госпитализации заболевания является не сам спирт, а сочетание недостатка тиамина и возможного снижения активности тиаминзависимого фермента–*транскетолазы* (разд. 23.21). Было высказано предположение, согласно которому умственное расстройство и другие симптомы болезни Вернике–Корсакова, можно было бы устранить, добавляя тиамин в крепкие спиртные напитки, вино и пиво, однако никаких попыток в этом направлении предпринято не было, так как это могло бы способствовать увеличению потребления спиртного.



А



Б

Рис. 26-9. *А*. Белая крыса, выращенная на рационе без тиамина. Недостаток тиамина приводит к поражению нервных клеток, в результате чего развивается полиневрит и паралич. Крыса теряет способность к координации движений (*Б*). Быстрое выздоровление этой же крысы всего лишь через 24 ч после перевода ее на полноценный рацион с нормальным содержанием тиамина.

26.10. Потребление никотинамида и триптофана с пищей взаимосвязано

При недостаточности никотинамида (рис. 26-10, см. также разд. 10.6) люди заболевают пеллагрой (от итал. «шероховатая кожа»). Впервые это заболевание было обнаружено в Европе, однако больных пеллагрой можно встретить в большинстве стран, где основным продуктом питания служит кукуруза, а пища бедна мясом или рыбой. Сейчас пеллагра встречается лишь в очень бедных странах, а также в больницах и тюрьмах, где людей плохо кормят. Для пеллагры характерны три «д»: дерматит, диаррея, слабоумие (последнее слово в английском языке также начинается с «д»).

Никотинамид (ниацинамид)

Коферментные формы:
никотинамидадениндинуклеотид
и его фосфат (NAD и NADP)

Функция: кофермент
многих дегидрогеназ

Рекомендуемая ежедневная доза: 19 мг

Синдром недостаточности: пеллагра

Рис. 26-10. Структура, функция и ежедневная доза никотинамида, называемого также ниацинамидом.

Если в пище содержится много кукурузы и мало мяса, может проявляться недостаточность никотинамида в силу двух биохимических особенностей кукурузы. Кукуруза содержит никотинамид в больших количествах, однако он находится в связанной форме, в которой не может усваиваться организмом. При ее обработке слабощелочными растворами связанный никотинамид высвобождается и может всасываться в кишечнике. Задолго до того, как это было обнаружено биохимиками, индейцы Мексики и Центральной Америки каким-то образом догадались перед приготовлением пищи замачивать кукурузу в известковой воде (т. е. в разбавленном растворе гидроксида кальция), получая таким образом содержащийся в них тиамин в свободном виде.

Еще одна важная в отношении пеллагры особенность кукурузы состоит в том, что ее белки содержат очень мало остатков триптофана. В то же время в организме человека и большинства животных никотинамид может образовываться из триптофана (разд. 19.4). Однако если в пище мало триптофана, то он практически целиком расходуется на биосинтез белка и не может быть использован в качестве предшественника никотинамида. Около 60 мг триптофана в пище эквивалентно 1 мг никотинамида.

Лучшими источниками никотинамида служат: постное мясо, горох, бобы, орехи и рыба, тогда как в молоке, яйцах и очищенном зерне его содержание сравнительно невелико. В белый хлеб, макароны, а также и в другие продукты, приготовленные из кукурузы, пшеницы и риса, обычно добавляют дополнительное количество никотинамида.

26.11. Многие пищевые продукты содержат мало аскорбиновой кислоты

В течение нескольких веков было известно, что цингу – болезнь, часто встречавшуюся среди моряков и путешественников, питавшихся консервированными продуктами, можно вылечить, если давать больным определенные растительные продукты или фруктовые и овощные соки. Одно из первых упоминаний о лечении этой болезни встречается в записях Жака Картье (дополнение 26-1), который еще в середине XVI в. путешествовал по Ньюфаундленду и р. Святого Лаврентия. Однако потребовалось более двух веков, прежде чем возможность лечения цинги была доказана систематическими экспериментами. В 60-х годах XVIII в. Джеймс Линд попытался вылечить группу моряков, страдающих цингой, с помощью шести различных диет. Лишь одна из них, в которой был лимонный сок, дала положительный эффект. Линд установил, что лечению цинги могут способствовать свежая зелень, различные овощи и фрукты, особенно цитрусовые. Несмотря на то что Линд тогда же рекомендовал включить лимонный сок в рацион моряков, Британскому адмиралтейству понадобилось еще полвека, чтобы претворить эти рекомендации в жизнь. Смерть от цинги подстерегала покорителей Арктики и Антарктики вплоть до начала XX в. Витамин, предотвращающий цингу, был выделен из лимонного сока в 1932 г. и вскоре после этого синтезирован. Он получил название аскорбиновой кислоты (рис. 26-11).

Хотя сейчас цинга уже перестала быть распространенной болезнью, тем не менее многие люди, особенно кормящие матери, часто ежедневно не получают требуемых организму количеств аскор-

```
    ┌────┐
 O=C    │
   |    │
HO—C    O
   ‖    │
HO—C    │
   |    │
  HC────┘
   |
 HOCH
   |
  CH2OH
```

Аскорбиновая кислота (витамин С)

Активная форма: неизвестна

Функция: кофактор в некоторых рвакциях гидроксилирования

Рекомендуемая ежедневная доза: 60 мг

Синдром недостаточности: цинга

Рис. 26-11. Структура, функция и ежедневиая доза аскорбиновой кислоты.

биновой кислоты. Аскорбиновая кислота распространена не так широко, как другие витамины, кроме того, она очень нестабильна. Она легко разрушается при нагревании в щелочных условиях, а также под действием кислорода в присутствии ионов железа или меди, катализирующих ее окисление с образованием неактивных продуктов. В мясе, яйцах и рыбе содержится сравнительно мало аскорбиновой кислоты. Пастеризованное, т. е. нагретое до 80–85°С, молоко также содержит очень мало аскорбиновой кислоты. В высушенных зернах злаков аскорбиновой кислоты нет совсем. Люди, не потребляющие систематически свежие овощи и фрукты, особенно пожилые и одинокие, склонны к субклинической недостаточности аскорбиновой кислоты.

Рекомендуемое взрослым в США количество ежедневно потребляемой аскорбиновой кислоты составляет приблизительно 60 мг (рис. 26-11, табл. 26-2), что значительно превышает минимальные потребности организма. В Англии достаточной ежедневной дозой для взрослых людей считается 20 мг, а для предотвращения цинги достаточно всего лишь 10 мг. Наилучшими источниками аскорбиновой кислоты являются цитрусовые, помидоры, ананасы, капуста и зеленые овощи, однако другие свежие овощи и фрукты также содержат значительные количества этого витамина. Аскорбиновой кислотой богаты кора и листья многих кустарников (дополнение 26-1).

Дополнение 26-1. Одно из первых письменных сообщений о лечении цинги среди участников экспедиции Жака Картье (Ньюфаундленд. 1535 г.)[1]

«Некоторые из нас теряли последние силы... У других же, кроме этого, на коже еще появлялись пятна крови пурпурного цвета, затем пурпурными становились локти, колени, бедра, плечи, руки и шея. Запах изо рта становился зловонным, десны сгнивали до такой степени, что обнажались корни зубов, после чего почти все зубы выпадали. Наш капитан, сознавая бедственность положения, решил покинуть форт и, выйдя на санную тропу, встретил на пути из Стадаконы группу местных жителей. Среди них был Домагайя, который не далее как 10–12 дней тому назад был тяжело болен этой же болезнью – его колени были опухшими, все мышцы были сморщены, зубы испорчены, а десны гнили и издавали зловонный запах. Увидев его живым и здоровым, наш капитан несказанно обрадовался возможности узнать, как ему удалось вылечиться, чтобы оказать помощь своим людям. Как только они приблизились друг к другу, капитан сразу спросил Дома-

[1] Из Haklyyt's Principal Navigators, 1600, перепечатано из книги: S. Davidson et al. (eds.): Human Nutrition and Dietics, 6[th] ed., Churchill Livingstone, Edinburg, 1975.

гайю, что помогло ему выздороветь. Домагайя ответил, что он пил сок листьев одного дерева. Тогда капитан спросил его, где растет это дерево... Домагайя сразу же послал двух женщин, и они принесли 10 или 12 веток этого дерева, а затем показали, как надо из его коры и листьев готовить отвар, который затем следует пить каждый день... На языке местных жителей дерево называлось Амеда или Ханнедью: это было дерево сассафраса лекарственного. Капитан сразу попросил приготовить такой напиток для своих людей, однако никто не хотел отважиться его пить, кроме одного или двух человек, которые все-таки решились на это. Следуя их примеру, другие поступили так же, и вскоре благодаря этому напитку все стали выздоравливать. После того как целебные свойства напитка перестали вызывать сомнение, по поводу того, кто будет пить его первым, разгорелись такие споры, что, казалось, люди были готовы убить друг друга. Дерево, не уступающее по размерам любому дубу во Франции, в течение 5 или 6 дней было ободрано совершенно дочиста, а целебный эффект оказался столь замечательным, что если бы все врачи Монпелье или Лована появились здесь со всеми лекарствами Александрии, то вряд ли им удалось бы в течение года достичь того, что было сделано благодаря этому дереву в течение шести дней. По воле Божьей все принимавшие настой из коры и листьев дерева восстановили свое здоровье».

Некоторые диетологи считают, что организм должен быть полностью «насыщен» сравнительно большими дозами аскорбиной кислоты. Согласно их точке зрения, организм человека еще со времен первобытной эры охоты и собирательства генетически приспособился к большим количествам аскорбиновой кислоты в пище, поскольку в то время основная часть растительных и животных продуктов не подвергалась кулинарной обработке. Существует также предположение, согласно которому для оптимального состояния здоровья, в частности для предотвращения распространенных простудных заболеваний, следует ежедневно принимать большие дозы аскорбиновой кислоты, порядка нескольких граммов в день. Тщательно проведенные клинические исследования не выявили, однако, статистически достоверной взаимосвязи между приемом больших доз аскорбиновой кислоты и частотой простудных заболеваний, хотя у некоторых людей наблюдался явный положительный эффект. Похоже, что большие дозы аскорбиновой кислоты не обладают токсическим действием; ее избыток, превышающий потребности организма, выводится либо в неизмененном виде, либо в виде различных продуктов ее окисления.

В наши дни из всех видов цинги чаще других встречается так называемая *цинга новорожденных*, возникающая у новорожденных, которых кормят пастеризованным или порошковым молоком без добавок аскорбиновой кислоты. У таких детей часто возникают спонтанные подкожные кровоизлияния, при ушибах легко образуются синяки.

26.12. Недостаточность рибофлавина – явление столь же частое, как недостаточность аскорбиновой кислоты

Некоторая недостаточность рибофлавина (рис. 26-12) сравнительно часто регистрируется во многих странах, в том числе в США. Она не привлекала большого внимания, поскольку почти никогда не приводит к последствиям, опасным для жизни. Чаще всего недостаточность рибофлавина наблюдается у беременных женщин, а также у растущих детей и людей в состоянии стресса. Характерными проявлениями недостаточности рибофлавина являются раздражение и растрескивание губ и уголков рта, дерматит на

Рибофлавин (витамин B_2)

Коферментные формы: флавиммононуклеотид и флавинадениндинуклеотид

Функция: кофермент в окислительно-восстановительных реакциях

Рекомендуемая ежедневная доза: 1,7 мг

Синдром недостаточности: поражения кожи и слизистых оболочек

Рис. 26-12. Структура, функция и ежедневная доза рибофлавина.

лице. Иногда наблюдается также анемия. Недостаточность рибофлавина часто проявляется в сочетании с недостаточностью других витаминов, например в случае пеллагры.

Наилучшими источниками рибофлавина служат молоко, печень, яйца, мясо и желтые овощи. Поскольку в хлебе и в крупах содержание рибофлавина очень мало, его часто специально добавляют в эти продукты.

26.13. Недостаточность фолиевой кислоты – наиболее распространенное явление

Во всем мире недостаточность фолиевой кислоты (рис. 26-13) считается наиболее распространенным случаем витаминной недостаточности. Чаще всего, однако, она встречается в слаборазвитых тропических странах, где практически все испытывают как минимум умеренную недостаточность фолиевой кислоты. В США многие бедные и престарелые люди страдают из-за нехватки фолиевой кислоты, которая проявляется в виде анемии, потери веса, общей слабости. Недостаточность фолиевой кислоты часто бывает у беременных женщин и новорожденных. Недостаточность этого витамина типична для *тропического спру* – заболевания, вызванного нарушением всасывания многих питательных веществ в тонком кишечнике.

В больших количествах фолиевая кислота содержится в зеленых листьях овощей, в печени, дрожжах и в мясе, однако при кулинарной обработке пищи и под воздействием восстанавливающих агентов она может разрушаться.

26.14. Недостаточность пиридоксина, биотина и пантотеновой кислоты у людей встречается крайне редко

Пиридоксин, биотин и пантотеновая кислота (рис. 26-14 – 26-16) содержатся в больших количествах во многих пищевых продуктах. При обычных условиях недостаточность этих витаминов у людей встречается крайне редко, но ее можно искусственно вызвать у добровольцев или обнаружить у людей, придерживающихся необычных диет. Оригинальный случай недостаточности биотина был обнаружен в больнице г. Бостона у пациента, который в течение многих месяцев питался исключительно

Фолиевая кислота

Активная форма: тетрагидрофолат

Функция: кофермент в ферментативных реакциях, протекающих с переносом одноуглеродных фрагментов

Рекомендуемая ежедневная доза: 400 мкг

Синдром недостаточности: анемия

Рис. 26-13. Структура, функция и ежедневная доза фолиевой кислоты.

H
H—C—OH
HO— —CH_2OH
H_3C— N

Пиридоксин (витамин B_6)

Коферментная форма: пиридоксальфосфат

Функция: кофермент в реакции трансаминирования и других реакциях, протекающих с участием аминокислот

Рекомендуемая ежедневная доза: 2,2 мг

Рис. 26-14. Структура, функция и ежедневная доза пиридоксина.

вином и сырыми яйцами. Сырые яйца богаты белками, минеральными веществами и витаминами, однако они содержат специфический белок–*авидин*, который связывает биотин и препятствует его всасыванию в кишечнике. Если же питаться не сырыми, а вареными яйцами, то недостатка в биотине не наблюдается, поскольку в результате тепловой денатурации авидин теряет способность связывать биотин.

Недостаточность этих трех витаминов имеет место, вероятно, у алкоголиков. Для некоторых жителей Востока типична тенденция к образованию в почках кальций-оксалатных камней из-за некоторой недостаточности пиридоксина. Недостаточность витамина B_6 была обнаружена у больных туберкулезом, когда их лечили *изониазидом*, который инактивирует пиридоксальфосфат–коферментную форму пиридоксина.

26.15. Дефицит витамина B_{12} в пищевом рационе встречается очень редко

Витамин B_{12} (рис. 26-17) препятствует развитию злокачественной анемии (разд. 10.11). Ни растения, ни животные не могут синтезировать витамин B_{12}, его могут образовывать лишь определенные бактерии. Бактерии желудочно-кишечного тракта человека способны синтезировать витамин B_{12} в количестве, достаточном для удовлетворения ежедневных потребностей человека. В больших количествах витамин B_{12} синтезируют также бактерии, обитающие в рубце жвачных животных и в слепой кишке (*цекуме*) других травоядных животных, например кроликов. Кролики удовлетворяют свои потребности в витамине B_{12} и некоторых других витаминах, время от времени поедая собственные фекалии.

Пернициозная анемия–тяжелое заболевание, при котором наблюдается дефицит гемоглобина и эритроцитов и серьезные нарушения деятельности централь-

COOH
CH_2
CH_2
CH_2
CH_2
H
CH—C—NH
S C=O
CH_2—C—NH
H

Биотин

Активная форма: биоцитин

Функция: простетическая группа пируваткарбоксилазы и других ферментов, участвующих в переносе CO_2

Предполагаемая ежедневная потребность: 150 мкг

Рис. 26-15. Структура, функция и ежедневная доза биотина.

COOH
CH_2
CH_2
NH
C=O
H—C—OH
H_3C—C—CH_3
CH_2
OH

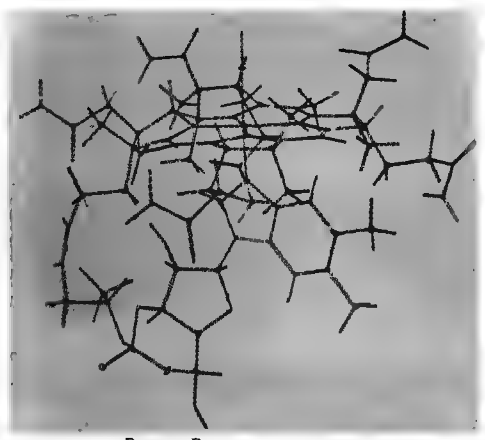
Пантотеновая кислота

Коферментная форма: кофермент А

Функция: переносчик ацильных групп при окислении пирувата и жирных кислот

Предполагаемая ежедневная потребность: 5–10 мг

Рис. 26-16. Структура, функция и ежедневная доза пантотеновой кислоты.



Витамин B_{12}

Коферментная форма: дезоксиаденозилкобаламин (кофермент B_{12})

Функция: кофермент в реакциях превращения метилмалонил-СоА в сукцинил-СоА и в некоторых других реакциях

Рекомендуемая ежедневная доза: 3,0 мкг

Синдром недостаточности: злокачественная анемия

Рис. 26-17. Стереомодель структурного скелета витамина B_{12} (кобаламина;, см. также разд. 10.11)

ной нервной системы. Она развивается не в результате недостатка витамина B_{12} в пище, а из-за неспособности всасывания этого витамина в кишечнике вследствие нарушения секреции определенного гликопротеина в желудке. Этот гликопротеин, получивший название *внутреннего фактора*, необходим для всасывания витамина B_{12}. Пернициозную анемию лечат инъекциями витамина B_{12} или пероральным введением больших доз этого витамина, которые могут компенсировать нарушение его всасывания. Поскольку печень человека может запасать витамин B_{12} в количествах, достаточных для удовлетворения потребностей человека в нем на протяжении нескольких лет, истинная недостаточность витамина B_{12} встречается крайне редко. Вегетарианцы удовлетворяют свои потребности в витамине B_{12} либо за счет бактерий кишечника, либо за счет бактерий, поступающих в кишечник вместе с растительной пищей.

26.16. Недостаточность витамина А приводит к многочисленным последствиям

Такие связанные с нарушением питания болезни, как *ксерофтальмия* («сухие глаза») и *кератомаляция* (избыточное образование кератина в коже и роговице глаз), широко распространены в Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америке и в некоторых районах Африки; в США они встречаются редко. Эти заболевания обусловлены недостаточностью витамина А (рис. 26-18) или каротина – предшественника витамина А. Каротин содержится в больших количествах в желтых растениях, таких, как морковь и батат. Особенно часто нехватка витамина А наблюдается у детей в тех районах, где люди питаются недостаточно калорийной и бедной белками пищей. В США недостаточность витамина А встречается у людей с заболеваниями кишечника или поджелудочной железы, при которых нарушается всасывание жи-

H_2C, CH_2, CH_3, CH_3, $C-CH_3$, HC, CH, $C-CH_3$, HC, CH, HC, $C-CH_2$, HC, CH_2OH

Витамин А (ретинол)

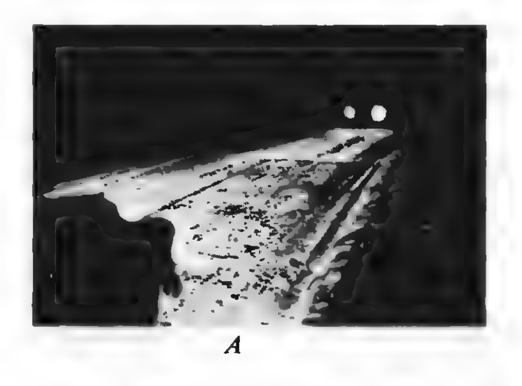
Активная форма: неизвестна

Функция: участвует в рецепции света; необходим для нормального развития тканей сетчатки

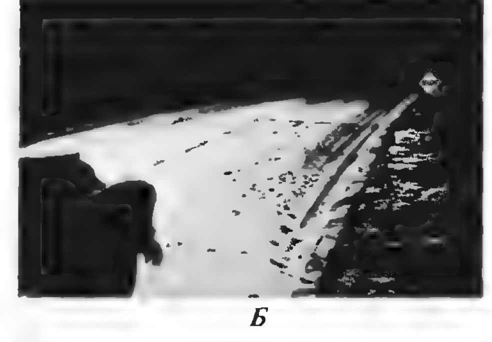
Рекомендуемая ежедневная доза: 1,0 мг

Синдром недостаточности: ночная слепота, ослабление сопротивляемости инфекциям

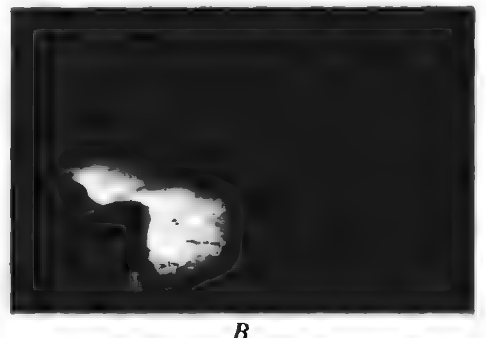
Рис. 26-18. Витамин А.



А



Б



В

Рис. 26-19. Ночная слепота при недостаточности витамина А. *А*. Свет фар приближающегося автомобиля увидят как здоровый человек, так и человек с недостаточностью витамина А. *Б*. После того как автомобиль проехал, здоровый человек видит длинную полоску дороги. *В*. Человек с недостаточностью витамина А с трудом видит лишь небольшой участок дороги и совсем не видит дорожного знака.

ров; такие люди не могут усваивать жирорастворимые каротин или витамин А. Ранние стадии ксерофтальмии проявляются в виде *ночной слепоты*. Это заболевание возникает в результате недостатка зрительного пигмента – *родопсина*, содержащего в качестве активной группы *ретиналь*, предшественником которого является витамин А (разд. 16.14) (рис. 26-19). При недостатке витамина А уменьшается также устойчивость всех тканей к инфекциям.

Витамин А запасается в печени в количествах, которых достаточно на несколько месяцев. Однократной 30-микрограммовой дозы витамина А ребенку хватает на 6 мес; в печени взрослого человека может накапливаться более 300 мкг витамина А. Особенно много витамина А содержится в печени рыб и млекопитающих, обитающих в холодных водах Арктики. Высокие дозы витамина А (в 20–30 раз превышающие рекомендованные) могут приводить к токсическим эффектам, которые проявляются в форме многочисленных болезненных симптомов. Некоторые исследователи Арктики даже погибали после того, как съедали печень полярного медведя, в которой содержится большое количество витамина А. Токсическое действие витамина А часто отмечают у людей, злоупотребляющих витаминными препаратами.

26.17. Недостаточность витамина D приводит к рахиту и остеомаляции

В свое время недостаточность витамина D была широко распространена во многих северных странах (разд. 10.15), однако сейчас в США она встречается крайне редко. У детей при нехватке витамина D развивается *рахит* (аналогом его у взрослых является *остеомаляция*) – заболевание, проявляющееся в размягчении и деформации костей из-за недостатка в них кальция. Оно обусловлено не недостатком кальция в пище, а нехваткой гормона – 1,25-дигидроксихолекальциферола (см. рис. 10-22), предшественником которого обычно служит *витамин* D_3, или холекальциферол. В благоприятных условиях витамин D может и не поступать в организм с пищей, так как при достаточном облучении кожи солнечными

Витамин D_3 (холекальциферол)
Активная форма:
1,25-дигидроксихолекальциферол
Функция: активный компонент гормона, регулирующего обмен Са и фосфата
Рекомендуемая ежедневная доза:
10 мкг
Синдром недостаточности:
рахит, остеомаляция

Рис. 26-20. Витамин D.



Рис. 26-21. Недостаточность витамина D обычно развивается при дефиците ультрафиолетового облучения солнечным светом, которое необходимо для превращения 7-дегидрохолестерола в витамин D_3. Существует предположение, что предки человека жили в тропиках и были темнокожими. По мере перемещения на север темный цвет кожи, защищающий ее от ультрафиолета, становился неблагоприятным, так как препятствовал синтезу витамина D. Сформировавшийся в результате генетического отбора белый цвет кожи способствовал лучшему усвоению ультрафиолетовых лучей у жителей севера. У эскимосов такого отбора не произошло, поскольку они получают большое количество витамина D с рыбой.

лучами холекальциферол, т.е. витамин D_3 (рис. 26-20), образуется из 7-дегидрохолестерола в результате фотохимической реакции. Однако при недостаточном воздействии солнечных лучей на кожу витамин D должен поступать в организм с пищей (разд. 10.15). Если лицо ребенка ежедневно хотя бы в течение получаса находится под прямыми лучами солнца, то этого достаточно для того, чтобы обеспечить минимальную суточную потребность в витамине D. Эскимосы во время арктической зимы практически лишены солнечного света, однако они имеют возможность получать необходимое количество витамина D вместе с богатой этим витамином рыбой (рис. 26-21).

Страдающие рахитом маленькие дети выглядят обычно хорошо упитанными, но при этом у них снижен мышечный тонус и замедлена походка. При рахите деформируются кости черепа, груди, позвоночника; особенно типичным признаком является искривление ног и поворот коленей вовнутрь. На ранних стадиях заболевания лечение витамином D может исправить слабовыраженную деформацию, однако на более поздних стадиях деформация становится необратимой.

У взрослых людей рахит проявляется в форме остеомаляции. Беременные женщины с ограниченным питанием особенно страдают от нехватки витамина D, поскольку развивающийся плод использует ионы Ca^{2+} из материнского скелета.

При недостаточности витамина D в пищу добавляют облученный *эргостерол*. Этот стерол из дрожжей легко превращается в *эргокальциферол* (разд. 10.15), который по своему действию аналогичен витамину D. Практически полное исчезновение рахита в США является следствием обогащения коровьего молока облученным эргостеролом. Ежедневная доза витамина D для взрослых людей, не подвергающихся облучению солнечным светом, составляет 10 мкг. Дозы, превышающие 1,5 мг в день, крайне токсичны.

26.18. Недостаточность витаминов E или K у людей встречается крайне редко

Поскольку в США содержание витаминов E и K в обычных продуктах питания значительно превышает минимальные ежедневные потребности, недостаточность этих витаминов – явление крайне редкое. Витамин K могут, кроме того, синтезировать бактерии кишечника. Витамины E и K относятся к жирорастворимым витаминам, поэтому их всасывание в тонком кишечнике может нарушаться при состояниях, сопровождающихся патологическими изменениями процесса всасывания липидов, в частности при нарушениях секреции желчных кислот. Витамин E (рис. 26-22) предохраняет липиды мембран от окислительной деструкции полиненасыщенных жирных кислот. Ежедневно рекомендуется потреблять 10–30 мг α-токоферола. В больших дозах токоферол не токсичен, однако нет никаких доказательств, что большие дозы токоферола улучшают цвет лица и вылечивают бесплодие, как считают некоторые энтузиасты.

Витамин K (рис. 26-23) дают новорожденным, а также больным до и после операций на печени или желчном пузыре с целью поддержания нормального уровня протромбина в крови. Недостаточность витамина K, как уже говорилось ранее (разд. 10.17), приводит к нарушениям ферментативного карбоксилирования определенных остатков глутаминовой кислоты в протромбине и других белках, участвующих в работе свертывающей системы крови. Очень большие дозы витамина K токсичны.

26.19. В пище человека должны содержаться многие химические элементы

Кроме шести «основных» элементов – углерода, водорода, азота, кислорода, серы и фосфора, – из которых состоят углеводы, жиры, белки и нуклеиновые кислоты, для нормального питания человеку и экспериментальным животным

HO, CH_3, CH_3, CH_3 (кольцо), O, CH_3
$-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_3$

Витамин E (α-токоферол)

Активная форма: неизвестна

Функция: точно не установлена; известно лишь, что витамин E может предотвращать повреждение мембран кислородом

Рекомендуемая ежедневная доза: 10 мг

Рис. 26-22. Витамин E.

O, O, $-CH_3$
$-CH_2-CH{=}C(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_3$

Витамин K

Активная форма: неизвестна

Функция: кофермент в реакции карбоксилирования глутаминовых остатков протромбина и других белков

Предполагаемая ежедневная потребность: 1 мг

Рис. 26-23. Витамин K_1.

нужны также многие другие химические элементы (табл. 26-13). Недостаточность микроэлементов у людей встречается редко скорее всего из-за того, что они в избытке содержатся в большинстве пищевых продуктов и питьевой воде. Имеются все основания считать, что люди нуждаются в тех же элементах, необходимость в которых доказана для крыс и цыплят. Не исключено также, что в результате развития в будущем новых экспериментальных методов, позволяющих изучать влияние недостаточности каких-либо питательных веществ, и расширения наших представлений об активных группах ферментов будут обнаружены новые необходимые человеку элементы, которые пока не вошли в табл. 26-13.

Таблица 26-13. Химические элементы, необходимые для нормального питания человека

Основные элементы	
Кальций	Фосфор
Хлор	Калий
Магний	Натрий
Микроэлементы	
Медь	Магний
Фтор	Молибден
Иод	Селен
Железо	Цинк
Некоторые микроэлементы, необходимость которых доказана для животных и весьма вероятна для человека	
Мышьяк	Кремний
Хром	Олово
Никель	Ванадий

Чтобы выяснить, необходим ли данный элемент организму, нельзя ограничиться простым микроанализом тканей экспериментальных животных. Ткани животных и человека могут содержать небольшие количества элементов, присутствие которых не является необходимым для образования какой-то биологической структуры или обеспечения какой-то функции, поскольку эти элементы могли попасть в организм случайно в качестве примесей пищевых продуктов. В качестве примера можно привести накопление токсичных количеств ртути в тканях тунцов и других рыб, характерное для районов, где море загрязнено промышленными отходами.

Ниже мы кратко рассмотрим элементы, нехватка которых в пище человека встречается сравнительно часто и может приводить к важным для здоровья последствиям. Химические элементы, необходимые для питания человека, могут быть разделены на *макро-* и *микроэлементы* (табл. 26-13). Напомним, что ежедневная потребность в макроэлементах 100 мг/сут, тогда как потребность в микроэлементах не превышает нескольких миллиграммов. Питательной ценностью обладают лишь биологически доступные химические элементы, которые присутствуют в пищевых продуктах в виде солей или других растворимых химических соединений.

26.20. Кальций и фосфор необходимы для развития костей и зубов

В организме взрослого человека содержится больше 1 кг кальция, который почти целиком находится в костях и зубах, образуя вместе с фосфатом нерастворимый кристаллический минерал – *гидроксилапатит кальция*. Кроме того, во всех клетках кальций играет роль важного внутриклеточного регулятора или посредника (разд. 25.23), помогая регулировать активности тканей скелетных и сердечной мышц, а также многих других органов. Кальций в больших количествах содержится во многих пищевых продуктах, особенно много его в молоке, сыре, зернах злаков, бобах, орехах и овощах. В питании человека кальций играет очень важную роль; потребность в нем очень велика у детей в связи с ростом костей, а также у беременных и кормящих женщин. Всасывание кальция в кишечнике зависит от многих факторов, в том числе от pH, соотношения между содержанием кальция и фосфора в пище, наличия в пище жирных кислот, в том числе некоторых кислот растительного происхождения, и в первую очередь от наличия витамина D, который регулирует процесс всасывания кальция. Из-за перечис-

ленных выше причин в кишечнике реально всасывается только часть поступающего с пищей кальция.

Изучение роли кальция в питании осложнено наличием очень большого и лабильного запаса кальция в костях, который может использоваться при недостатке кальция в пище. Например, у беременных или кормящих женщин при недостаточном количестве кальция в пище запас кальция в костях используется для роста плода или образования богатого кальцием молока. Бóльшая часть кальция в костях постоянно обновляется. Ежедневно из костей скелета уходит и в них возвращается примерно 700–800 мг кальция. Мощный резервуар кальция в скелете может легко удовлетворять кратковременные потребности других тканей.

Взрослым людям рекомендуется ежедневно потреблять с пищей 800 мг кальция (табл. 26-2), беременным, кормящим женщинам и подросткам – 1200 мг в день. Всасывание кальция в кишечнике из зерен злаков затруднено, так как основная его часть прочно связывается с *инозитолгексафосфатом* (или фитатом, рис. 26-24), образуя кальций-магниевую соль *фитин*. Как мы увидим дальше, фитат связывает и другие важные для питания человека элементы, особенно цинк.

Количество фосфора в организме человека также очень велико. Он входит в состав не только костей, но и нуклеиновых кислот, нуклеотидных коферментов и ATP – ADP-фосфатной системы, обеспечивающей сохранение и превращение энергии в организме. Фосфор настолько

Рис. 26-24. Анион фитата. Многочисленные фосфатные группы фитата могут очень прочно связывать ионы Ca^{2+}, Mg^{2+} и Zn^{2+}, предотвращая таким образом их всасывание. Фитаты обнаружены только в растительных продуктах, особенно много их в зернах злаков.

широко распространен в пищевых продуктах, что случаи его явной недостаточности практически неизвестны. Однако далеко не весь фосфор, содержащийся в пищевых продуктах, может всасываться, поскольку его всасывание зависит от многих факторов, аналогичных тем, от которых зависит всасывание кальция, и в частности от наличия в пище витамина D.

26.21. Некоторая недостаточность магния – явление сравнительно частое

В организме человека содержится около 25 г магния, большая часть которого сосредоточена в костях. Во всех клетках концентрация магния сравнительно велика (5–10 мМ). Ионы Mg^{2+} играют очень важную роль во многих ферментативных реакциях, особенно в гликолизе и ATP-зависимых реакциях. Несмотря на то что бóльшая часть пищевых продуктов содержит значительные количества магния (особенно много его в хлорофилле зеленых овощей), становится все более очевидным, что в США содержание этого элемента в пище часто все же недостаточно, например в рационе престарелых и малообеспеченных людей. Очень чувствительны к нехватке магния алкоголики; у них она часто наблюдается на фоне белково-калорийной недостаточности пищи. Взрослым мужчинам рекомендуется ежедневно потреблять 350 мг магния.

26.22. Содержание натрия и калия в пище имеет важное значение для профилактики и лечения гипертонии

Натрий и калий в больших количествах присутствуют почти во всех продуктах питания, и явная недостаточность этих элементов – явление крайне редкое. Проблемы, связанные с этими элементами, возникают, как правило, не в результате их недостатка, а вследствие дисбаланса. Ион Na^{+} представляет собой основной внеклеточный катион, ион K^{+} –

основной внутриклеточный катион в организме человека. Оба эти иона играют очень важную роль в регуляции водно-электролитного и кислотно-основного равновесий. Содержание каждого из них в свою очередь регулируется минералокортикоидными гормонами коры надпочечников (разд. 25.18).

Истинная ежедневная потребность организма в натрии составляет всего 1 г, тогда как среднее потребление этого элемента в США достигает приблизительно 5 г. Так же, как и в случае с сахаром, употребление соли резко возросло за последнее время. Многие люди испытывают прямо-таки «жажду» в отношении соли и могут съедать до 10 г натрия в день. Непрерывное потребление избыточных количеств NaCl не только способствует преждевременному появлению *гипертонии*, но и существенно осложняет протекание этого, встречающегося чаще у негров, чем у белых, заболевания, развитие которого в значительной мере зависит от генетических факторов. Больным гипертонией рекомендуется ограничивать потребление соли.

В США каждый человек ежедневно потребляет в среднем около 4 г калия, однако обильные потери калия организмом, характерные при диабете и поносах, или при использовании диуретических препаратов для лечения гипертонии могут приводить к значительной нехватке калия в организме. Особенно много калия содержится в томатном соке, цитрусовых и бананах.

26.23. Железо и медь необходимы для синтеза гемовых белков

У жителей Северной Америки дефицит железа в организме – одно из наиболее распространенных последствий неправильного питания. Особенно характерен он для детей, девочек-подростков и женщин детородного возраста. Железо может всасываться только в виде ионов Fe^{2+}; его всасывание и выведение протекают очень медленно и зависят от многих сложных факторов. Усваивается лишь незначительная часть присутствующего в пищевых продуктах железа. Более того, способность железа усваиваться сильно варьирует для разных пищевых продуктов. Лучше всего железо усваивается из мяса, значительно хуже – из зерновых злаков. Молоко содержит очень мало железа.

Железо необходимо для синтеза железо-порфириновых белков – гемоглобина, миоглобина, цитохромов и цитохромоксидазы (рис. 26-25). В крови железо переносится в форме комплекса с плазменным белком *трансферрином*, а в тканях оно накапливается в виде *ферритина* – белкового комплекса, содержащего гидроксид и фосфат железа. Ферритин в больших количествах содержится в печени, селезенке и костном мозгу. Железо

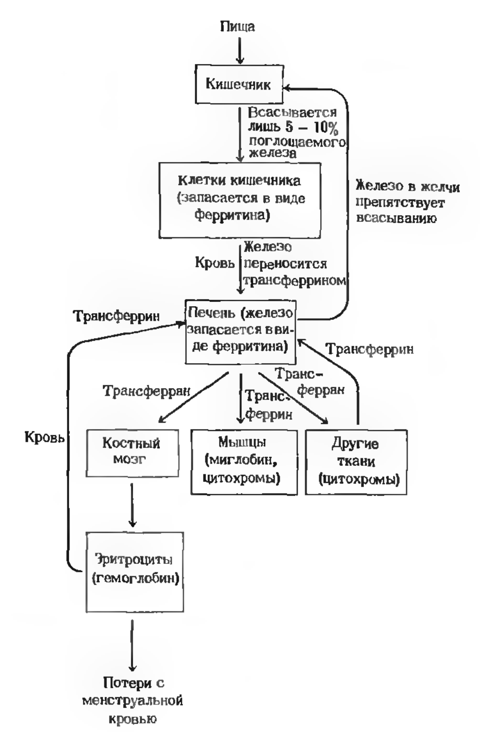


Рис. 26-25. Всасывание, запасание и использование железа в ходе синтеза цитохромов, миоглобина и гемоглобина. После всасывания в кишечнике железо всегда связывается с белками; в крови железо транспортируется в форме трансферрина, а в клетках запасается в форме ферритина. Когда возможности ферритина как хранилища железа исчерпываются, железо накапливается в митохондриях некоторых тканей в виде нерастворимых гранул гемосидерина.

не выводится из организма с мочой, оно выделяется с желчью и калом, а также при кровотечениях. Из-за удвоенных или даже утроенных потерь железа во время менструаций женщинам необходимы бóльшие количества железа, чем мужчинам. В хлеб и другие злаковые продукты специально добавляют дополнительное количество железа, однако это далеко не всегда является решением проблемы недостаточности железа, так как многие девушки и женщины, следя за своим весом, исключают хлеб из рациона. Недостаток железа приводит к железодефицитной анемии, при которой число эритроцитов в крови остается нормальным, а содержание гемоглобина в них уменьшается.

Ионы меди также обязательно должны содержаться в пище, поскольку они способствуют правильному усвоению железа, особенно при синтезе цитохромоксидазы, в состав которой входят как железо, так и медь. Медь необходима также для правильного развития соединительных тканей и кровеносных сосудов. Ежедневно организму требуется 2,5–5,0 мг меди. Много меди в мясе, морских продуктах, овощах и орехах, тогда как молочные продукты медь не содержат.

26.24. Зоб – результат дефицита иода

В некоторых удаленных от моря районах земного шара, например в горных районах Европы, Центральной Африки и на Среднем Западе США около Великих Озер, у многих наблюдается увеличение щитовидной железы – простой зоб (рис. 26-26). Оно обусловлено в основном недостатком иода в почве на удаленной от моря территории. В США зоб встречается все реже из-за широкого распространения замороженных морских продуктов, однако эта проблема до сих пор волнует медиков.

Щитовидная железа накапливает содержащийся в крови иод и использует его для синтеза тиреоидных гормонов (разд. 25.19). При нехватке иода щитовидная железа компенсаторно увеличивается, чтобы более эффективно экстрагировать иод из крови. При длительной нехватке иода щитовидная железа может достигать огромных размеров (она весит несколько фунтов), что иногда представляет опасность для жизни человека. Значительная нехватка иода у матерей может серьезно сказаться на развитии детей, у которых могут появляться признаки кретинизма: умственная отсталость, замедление развития, карликовость и типичные для этого заболевания черты лица.

Развитие зоба легко предупредить. Обогащенная иодом поваренная соль (0,5 г иодида калия на 1 кг NaCl) легко доступна в США и очень эффективна для предотвращения образования зоба, однако люди, которые в ней нуждаются, не всегда ее используют. К сожалению, обогащенная иодом поваренная соль во многих странах не производится.

26.25. Кариес зубов – важная проблема, связанная с питанием

Кариес зубов считается одной из наиболее распространенных болезней в США; по сравнению с другими заболеваниями, обусловленными нарушением питания, кариес также является наиболее распространенным. В некоторых районах

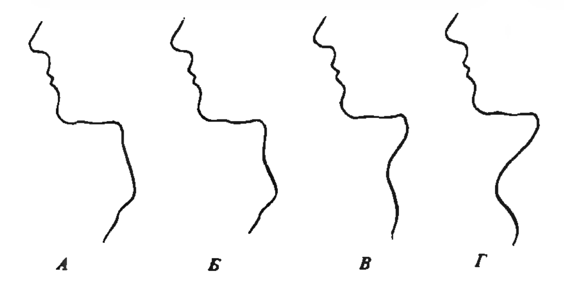


Рис. 26-26. Профили шеи на разных стадиях развития иододефицитного зоба: нормальный (*А*), ранняя стадия (*Б*), умеренный зоб (*В*) и тяжелая форма зоба (*Г*).

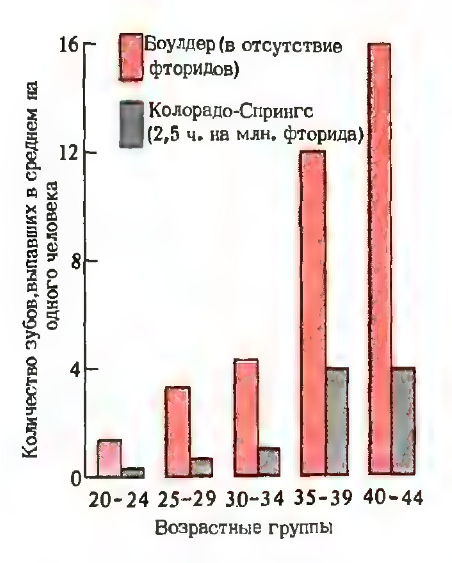


Рис. 26-27. Доказательство положительного действия фторидов на двух группах жителей Колорадо. Количество выпавших зубов в пересчете на одного человека (для людей в возрасте от 40 до 44 лет) в Боулдере составило 16, а в Колорадо-Спрингс – только 4.

от последствий кариеса: выпадения зубов, пломб и зубных протезов – страдает до 90% населения. Между распространенностью кариеса и потреблением чистых сахаров наблюдается положительная корреляция, в связи с чем кариес можно рассматривать как заболевание населения высокоразвитых стран.

Существует, однако, еще один фактор питания, влияющий на распространение кариеса. В ходе сравнительных статистических исследований распространенности кариеса, проведенных на двух группах людей, представители первой группы получали воду, в которую было добавлено определенное количество фтора, тогда как представители второй группы получали воду, не содержащую фтора (рис. 26-27). Это исследование показало, что добавление в воду фтора в концентрации всего лишь 1 ч на млн. значительно уменьшает вероятность развития кариеса. Сейчас в США более 9000 компаний, снабжающих водой более половины населения США, используют в городских водопроводных магистралях фторированную воду.

К сожалению, некоторые группы городских жителей энергично протестовали против фторирования водопроводной воды. Некоторые объясняли свой протест тем, что фтор – это лекарство, а они не хотят подвергаться лечению, другие видели в этом подавление их свободы выбора или прав личности, а некоторые в принципе придерживаются теории чистой неизмененной пищи. Избыток фтора в питьевой воде, действительно, вреден и может вызывать *флюороз*, для которого характерно развитие крапчатости зубов. Это состояние встречается у детей в некоторых районах США из-за высокого содержания фтора в почве и воде данной местности. Однако фтор – это не лекарственный препарат. Это важный элемент, присутствие которого в пище необходимо для правильного формирования костей и зубов. Фтор соединяется с гидроксилапатитом – кристаллическим минералом, из которого состоят кости и зубы, образуя *фторапатит* (рис. 26-28). Хотя фторапатит составляет лишь небольшую долю кристаллических компонентов кости, тем не менее именно его присутствие придает кристаллам гидроксилапатита прочность и кислотоустойчивость. Натуральные и рафинированные продукты питания не всегда содержат достаточные количества фторидов, в связи с чем фторирование питьевой воды (производимое аккуратно) очень важно особенно для растущего организма детей, так как потребление достаточных количеств фторидов с детства имеет огромное значение для правильного развития организма (рис. 26-27).

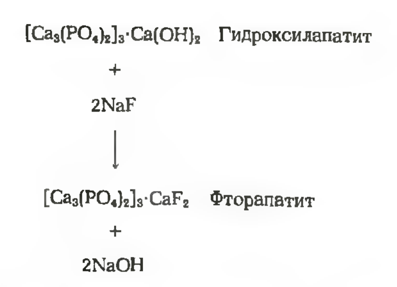


Рис. 26-28. Действие фторида натрия на гидроксилапатит.

26.26. Цинк и некоторые другие микроэлементы – незаменимые компоненты пищи

Известно, что цинк входит в состав простетических групп более 80 ферментов, таких, как алкогольдегидрогеназа, карбоангидраза, ДНК- и РНК-полимеразы и карбоксипептидаза. В больших концентрациях цинк содержится в предстательной железе, сперматозоидах и тканях глаза, где он выполняет важные, но до сих пор неизвестные функции. В некоторых сельских районах Ирана обнаружена эндемическая недостаточность цинка. Она проявляется в миниатюрном телосложении, анемии, низком уровне сывороточного альбумина и замедленном развитии репродуктивной системы. Недостаточность цинка обусловлена потреблением традиционного местного блюда – бездрожжевого хлеба из частично очищенной муки, который содержит большое количество фитата (рис. 26-24); последний очень прочно связывается с цинком, затрудняя тем самым его всасывание кишечником. Необычное и довольно редкое проявление недостаточности цинка у отдельных людей состоит в нарушении восприятия ими вкуса и запахов. Некоторые запахи искажаются до такой степени, что обыкновенная пища или кулинарные запахи кажутся отвратительными, в результате чего у человека возникает отвращение к пище и как следствие наблюдается сильное похудание. Взрослым необходимо потреблять с пищей по крайней мере 15 мг цинка в день; беременным и кормящим женщинам требуются бóльшие его количества (табл. 26-2). Много цинка в мясе, яйцах, морских продуктах, молоке, печени, но его мало во фруктах и зеленых овощах.

Крысы, цыплята и другие экспериментальные животные, которые растут в стерильных условиях в пластмассовых клетках, не содержащих следов металлов, и получают лишь дистиллированную воду, профильтрованный воздух и высокоочищенные продукты питания, для правильного роста и жизнедеятельности нуждаются также в некоторых других микроэлементах. В основном эти элементы необходимы и человеку. Это *олово*, *никель*, *ванадий*, *хром* и *кремний*, необходимый для правильного роста костей и соединительных тканей. *Кобальт* является неотъемлемой частью молекулы витамина B_{12} и поэтому необходим микроорганизмам, вырабатывающим этот витамин. Кобальт нужен также и некоторым животным, по-видимому, для синтеза витамина B_{12} микроорганизмами желудочно-кишечного тракта. *Селен*, важный компонент фермента *глутатионпероксидазы*, и *молибден*, входящий в состав простетической группы ферментов *ксантиноксидазы* и *альдегидоксидазы*, также необходимы организму животных и человека. Селен в избытке очень токсичен. В некоторых районах на западе США и в Новой Зеландии избыток селена в почве и растениях вызывает у лошадей заболевание, известное под названием кóлер (blind staggers), и *щелочную болезнь* у крупного рогатого скота. Такие элементы, как медь, кобальт, цинк, марганец и никель, хотя и являются важными компонентами пищи, в избытке ядовиты и создают опасность для здоровья людей, работающих в шахтах, где их добывают, и на предприятиях металлургической промышленности, где с ними постоянно работают.

26.27. Сбалансированный рацион должен быть многокомпонентным

Не существует какого-то одного универсального продукта, который полностью удовлетворял бы пищевые потребности любого человека. Сорок необходимых компонентов питания содержатся в самых различных продуктах в разных соотношениях. Простое и удобное руководство для подбора полноценного рациона представлено в табл. 26-14, в которой все продукты разделены на четыре основные группы. В этой таблице указаны продукты каждой группы, которые необходимо употреблять в пищу ежедневно, чтобы рацион был разумно сбалансированным. Во избежание преимущественного потребления одного

Таблица 26-14. Четыре основные группы пищевых продуктов. Руководство для их рационального суточного потребления; продукты внутри каждой группы необходимо варьировать

Молочные продукты
Два стакана молока или две порции сыра, сырковой массы, мороженое или другие молочные продукты

Мясные продукты
Две порции мяса, рыбы, птицы или два яйца; в качестве гарнира могут быть использованы на выбор горох, бобы или орехи

Овощи и фрукты
Четыре порции зеленых или желтых овощей, помидоров, цитрусовых

Хлеб и крупы
Четыре порции блюд, приготовленных из цельных злаков или обогащенных крупяных продуктов

или нескольких продуктов из определенной группы выбор продуктов из каждой группы следует день ото дня менять. Лучшая гарантия правильного питания – это разнообразный рацион с определенным соотношением калорий и белков, которое соответствует индивидуальным потребностям человека в зависимости от его роста, веса и степени физической активности.

Людям всегда были свойственны иррациональные навязчивые идеи относительно пищи, они наделяли некоторые продукты почти чудодейственной силой или накладывали строгое табу на другие. Выбор продуктов питания часто определяется религиозными соображениями, а также культурными или этническими особенностями. Более того, народный фольклор утверждает, что определенные продукты хороши для мозга, другие для роста волос, третьи для деторождения. Даже сегодня при высоком уровне развития науки о питании предрассудки и причуды относительно продуктов питания не только широко распространены, но иногда даже модны, как, например, в случае «органической», «продлевающей жизнь», или так называемой Дзен-диеты. Часто приходится сталкиваться просто с ошибочными представлениями о продуктах питания. Например, спортсменам утром перед соревнованиями часто рекомендуют только богатую белком пищу: мясо, рыбу, яйца и пр. Однако организм не может запасать белки, и они не так эффективны в качестве источников энергии, как углеводы. С точки зрения биохимика, разумнее перед соревнованиями съедать большое количество углеводов, пополняя тем самым запасы гликогена в печени и мышцах, поскольку гликоген служит основным топливом во время больших физических нагрузок.

26.28. Специальные этикетки на продуктах питания служат интересам потребителей

Законы, защищающие интересы потребителей в США, требуют, чтобы на этикетках упаковок пищевых продуктов содержались данные об их питательной ценности. Сопоставляя эти данные с ценами в пересчете на единицу веса, покупатель может количественно оценить «удельную стоимость» различных видов продуктов одного и того же типа. Особенно ценна информация на этикетках выпускаемых в широком ассортименте наборов для завтрака. В табл. 26-15 приведена информация о питательной ценности широко рекламируемой смеси для

Таблица 26-15. Информация, напечатанная на коробке популярных в США кукурузных хлопьев

Питательная ценность в пересчете на одну унцию (28,4 г)

	в чистом виде	плюс полчашки цельного молока с добавкой витамина D
Калории	110	180
Белки	2 г	6 г
Углеводы	26 г	31 г
Жиры	0 г	4 г
Натрий	195 мг	255 мг

Доля от суточных рекомендованных в США доз (в %)

	в 1 унции (28,4 г) чистого продукта	плюс полчашки цельного молока
Белок	2	10
Витамин A	25	30
Витамин C	25	25
Тиамин	25	30
Рибофлавин	25	35
Никотинамид	25	25
Кальций	<2	15
Железо	10	10
Витамин D	10	25
Витамин B_6	25	25
Фолиевая кислота	25	25
Фосфор	2	15
Магний	<2	4
Цинк	<2	4
Медь	2	2

Углеводы

	1 унция (28,4 г) чистого продукта	плюс полчашки цельного молока
Крахмал и сходные углеводы	13 г	13 г
Сахароза и другие сахара	13 г	18 г
Суммарное количество углеводов	26 г	31 г

Ингредиенты: молотая кукуруза, сахар, соль, солодовая ароматизирующая добавка, аскорбиновая кислота, витамин А, пальмитат, ниацинамид, восстановленное железо, пиридоксингидрохлорид, рибофлавин, тиамингидрохлорид, фолиевая кислота и витамин D_3. Для увеличения продолжительности хранения добавлен ВНА (бутилированный гидроксианизол).

детского питания (хлопьев), характерная особенность которой состоит в высоком содержании свободного сахара. Обратите внимание, что единственным натуральным ингредиентом этого продукта служит молотая кукуруза, остальную же его часть составляют ароматические вещества, консерванты, витамины и минеральные вещества. Одна унция (28,4 г) этого продукта содержит 26 г углеводов, 2 г белка и совсем не содержит жира, т. е. на долю углеводов приходится 93% веса хлопьев. Углеводы представлены крахмалом и сахарами в равных количествах; доля свободного сахара при этом составляет около 47%, что значительно превышает рекомендованную для полноценного рациона оптимальную дозу (см. рис. 26-2). Столь высокое содержание свободного сахара нежелательно, так как при этом у детей развивается кариес зубов. Добавленное к хлопьям молоко привносит 67% белка и почти 40% калорий. Хлопья обогащены разнообразными витаминами, а также ионами железа и цинка. Обозначение на их этикетке содержания натрия имеет важное значение для лиц, страдающих гипертонией.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

Davidson S., Passmore R., Brock J.F., Truswell A.S. (eds.). Human Nutrition and Dietetics, 6th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1975.

Human Nutrition: Readings from Scientific American, Freeman, San Francisco, 1978.

The Nutrition of Man, special issue of the British Medical Journal, vol. 37 (1981).

Underwood E.J. Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Academic Press, New York, 1977.

Специальная

Chisholm J.J., Jr. Lead Poisoning, Sci. Am., **224**, 15-23 February (1971).

Feenstrom W.D., Wurtman R.J. Nutrition and the Brain, Sci. Am., **230**, 84–91 Ferbryary (1974).

Food and Agriculture, Sci. Am., **235** September (1976). Достаточно полный обзор статей по данной теме.

Goldwater L.J. Mercury in the Environment, Sci. Am., **224**, 15–21 May (1971).

Harpstead D.D. High-Lysine Corn, Sci. Am., **225**, 34–42, August (1971).

Janick J., Noller C.H., Rhykerd C.L. The Cycles of Plant and Animal Nutrition, Sci. Am., **235**, 74–86, September (1976).

Kermode G.O. Food Additives, Sci. Am., **226**, 15–21, March (1972).

Kretchmer N. Lactose and Lactase, Sci. Am., **227**, 70–78, October (1972).

Lieber C.S. The Metabolism of Alcohol, Sci. Am., **234**, 25–33, March (1976).

Loomis W.F. Rickets, Sci. Am., **223**, 76–91, December (1970).
Mayer J. The Dimensions of Human Hunger, Sci. Am., **235**, 40–49, September (1976).
Nutrition Misinformation and Food Faddism, Nutrition Reviews, Special Supplement, July (1974).

Вопросы и задачи

1. *Рекомендации по ежедневному рациону питания.* Почему цифры в ежедневном рационе питания, рекомендованном Отделом пищевых продуктов и питания (табл. 26-2), отличаются от минимальных ежедневных потребностей?
2. *ATP, образованный из глюкозы или жирной кислоты.* Рассчитайте, сколько молей ATP синтезируется при оксислительном фосфорилировании из 1 г глюкозы и 1 г пальмитиновой кислоты в стандартных условиях. Сравните ваши результаты с количеством тепла, выделяющимся при сжигании 1 г глюкозы и 1 г пальмитиновой кислоты в калориметрической бомбе (табл. 26-5).
3. *Потеря веса при голодании.* Когда человек использует «ударную» строгую диету, сначала он теряет вес в основном за счет обезвоживания организма. Почему? При продолжительном голодании потеря веса за день меньше, чем в начальный период. Как вы это объясните?
4. *Связь между питанием и ожирением.* Потребление в течение продолжительного периода продуктов, калорийность которых превышает рекомендуемые дозы, может привести к ожирению. Диета какого типа, богатая сахарами или жирами, способствует ожирению? Поясните ваш ответ.
5. *Калориметрия пищевых продуктов.* Пробу пшеничных хлопьев весом 9,5 г подвергли полному окислению до CO_2 и H_2O путем сжигания в калориметрической бомбе. При этом 2500 г воды, заполняющей калориметр, нагрелось от 15 до 27°С.
   а) Рассчитайте калорийность пшеничных хлопьев в килокалориях на грамм.
   б) Если начальное содержание влаги в пшеничных хлопьях составляло 25%, то какова калорийность сухих хлопьев?
   в) Исходя из приведенных выше данных и из других соображений, сформулируйте предполоченне о том, что́ является основным компонентом пшеничных хлопьев: углеводы, белки или жиры? Объясните ваш ответ.
   г) Если человек съедает пшеничные хлопья, выделяется ли при этом такое же количество энергии, как в калориметре? Если нет, то почему?
6. *Баланс калорий.* Молодая женщина, студентка старшего курса колледжа, обнаружила, что она слишком поправилась за последний год. Ее диета содержала 2400 ккал/сут. Таблицы стандартных корреляций роста, телосложения, возраста и веса показывали, что излишек ее веса составляет ~ 20%. Для постоянного поддержания веса на нормальном уровне она должна в день получать в среднем 2100 ккал. Используя данные, приведенные в этой главе, предложите шесть разных видов пищи, которые следует потреблять этой женщине в ограниченном количестве, чтобы поддерживать нормальный вес.
7. *Баланс азота и пищевые белки.* У здорового юноши, который придерживается диеты, содержащей сбалансированное количество незаменимых аминокислот, наблюдается положительный баланс азота, т.е. общее количество поглощенного в сутки азота превышает общее количество, выделяемого в сутки азота. В отличие от этого у человека, придерживающегося диеты с дефицитом по одной (или большему числу) незаменимых аминокислот, наблюдается отрицательный баланс азота, т.е. общее количество поглощенного в сутки азота меньше общего количества азота, выделяемого в сутки. Объясните, почему это происходит?
8. *Экспериментальное определение потребности в аминокислотах.* Опишите схему эксперимента, который позволил бы определить минимальную суточную потребность белой крысы в аминокислоте – фенилаланине.
9. *Изначальная потеря веса при лечении квашиоркора.* При переводе маленьких детей, больных квашиоркором, на полноценную диету сначала они теряют в весе. Объясните, почему.
10. *Питание и болезнь почек.* Люди с почечной недостаточностью теряют способность выводить из организма шлаковые продукты с достаточной скоростью. Они должны регулярно подвергаться диализу, в процессе которого кровь диализуется через мембрану, чтобы вымыть такие продукты, как мочевнна и мочевая кислота. Кроме того, их рацион должен содержать ограниченное количество определенных белков. Объясните, почему. Какой источник белка предпочтительнее для их пита-

ния – яйца или кукуруза? Почему?

11. *Потребность в витамине B_6 и пищевой рацион.* Когда человек переходит на рацион с высоким содержанием белка, у него возрастает потребность в витамине B_6. Дайте возможные объяснения этому явлению.
12. *Исследования питания и кишечные бактерии.* Одной из трудностей при исследованиях питания человека является неопределенность, связанная с влиянием экспериментальной диеты на кишечные бактерии. Почему следует учитывать это соображение?
13. *Необходимость в особой пище.* Распространено мнение, что молоко – это превосходная пища, и для правильного питания оно должно быть включено в рацион каждого человека. Верно ли это? Предложите биохимическое обоснование своего ответа.
14. *Пища для альпинистов.* Предположим, что нужно составить список продуктов для альпиниста, собирающегося в 48-часовое восхождение на одну из вершин Гималаев.
    а) Какие характеристики и требования вы считали бы главными в рационе для такого случая?
    б) Какие особые виды продуктов вы бы включили?
    в) Какие продукты вы сочли бы ненужными?
    г) Какие витамины и минеральные вещества вы бы предложили в дополнение к рациону? Дайте объяснение своим ответам.
15. *Спирт как предшественник жиров и углеводов.* Этанол полностью превращается в триацилглицеролы, но не может быть превращен в глюкозу или гликоген. Почему?
15. *Калорийность пива.* Студент старшего курса колледжа, поддерживающий свой вес постоянным на рационе, соответствующем потреблению 2900 ккал/сут, приобрел также привычку выпивать одну банку пива в день весом 350 г. Сколько новых жировых отложений у него появится через 3 года, если все другие факторы, например физическая нагрузка, останутся постоянными? (Фактическое увеличение его веса будет больше, так как отложение жира в жировой ткани требует увеличения объема крови и внеклеточной жидкости.)
17. *Мясо как источник калорий.* В нескольких районах земного шара с легко доступными источниками природных ресурсов принято во время каждой еды потреблять большие количества мяса. Если любители мяса едят его в количестве, превышающем их потребности (в калориях), они могут приобрести «лишний» вес.
    а) Каким метаболическим путем мясо, богатое белком, может привести к отложению триацилглицеролов?
    б) Какие другие метаболические изменения могут произойти в результате такого питания?

ЧАСТЬ IV

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

В этой последней части книги мы рассмотрим биохимические вопросы, связанные с генетической непрерывностью и эволюцией живых организмов. Какова молекулярная природа генетического материала? Каким образом осуществляется столь точная передача генетической информации? Как эта информация в конечном счете переводится в аминокислотную последовательность белковых молекул?

Результаты современных биохимических исследований структуры и функции гена привели к революции в биологии, сравнимой с той, которую вызвала более ста лет назад дарвиновская теория происхождения видов. Серьезное влияние этих результатов испытали по существу все разделы биологии и медицины. Благодаря биохимической генетике стало возможным более глубокое изучение ряда наиболее фундаментальных проблем, касающихся структуры и функции живых клеток. Более того, биохимическая генетика расширила рамки теоретической биохимии.

Нынешний уровень понимания молекулярных аспектов генетики был достигнут в результате объединения усилий трех различных наук, а именно генетики, биохимии и молекулярной физики. Вклад всех этих трех наук нашел свое концентрированное выражение в событии, открывшем современную эру в биохимической генетике. В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик постулировали структуру двойной спирали ДНК. Их гипотеза, правильность которой была подтверждена в дальнейшем в многочисленных экспериментах самого разного рода, представляла собой результат совместных усилий генетической теории, выдвинувшей концепцию кодирования генетической информации с помощью генов, физики, которая позволила определить молекулярную структуру ДНК методом рентгеноструктурного анализа, и биохимии, которая позволила установить химический состав ДНК и принцип спаривания комплементарных оснований. Гипотеза Уотсона–Крика не только объяснила структуру молекулы ДНК, но и показала, каким образом эта молекула может точно реплицироваться. Это вскоре привело к формулированию *центральной догмы* молекулярной генетики (см. рисунок), которая определяет три главных этапа в обработке генетической информации. Первый этап – *репликация*, т.е. копирование родительской ДНК с образованием дочерних молекул ДНК, нуклеотидная последовательность которых комплементарна нуклеотидной последовательности родительской ДНК и однозначно определяется ею. Второй этап – *транскрипция*, процесс, в ходе которого часть генетической информации переписывается в форме рибонуклеиновой кислоты (РНК). И, наконец, третий этап – трансляция, в процессе которой генетическая информация, записанная при помощи четырехбуквенного кода в РНК, переводится в рибосомах на двадцатибуквенный код белковой структуры.

В последующих главах мы рассмотрим, как реализуются все эти этапы. Мы встретимся с новым понятием – с концепцией хранения и передачи молекулярной информации, которой в предыдущих разделах данной книги мы касались лишь вскользь. Сначала мы изучим природу, размеры и конформацию функцио-

mRNA START → A START

CCGTCAGGATTGACACCCTCCCAATTGTATGTTTTCATGCCTCCAAATCTT[redacted]CTTTTTATGGTTCGTTCTTATTACCCTTCTGAA

TGTCACGCTGATTATTTTGACTTTGAGCGTATCGAGGCTCTTAAACCTGCTATTGAGGCTTGTGGCATTTCTACTCTTTCTCAATCCCCA

ATGCTTGGCTTCCATAAGCAGATGGATAACCGCATCAAGCTCTTGGAAGAGATTCTGTCTTTTCGTATGCAGGGCGTTGAGTTCGATAAT

GGTGATATGTATGTTGACGGCCATAAGGCTGCTTCTGACGTTCGTGATGAGTTTGTATCTGTTACTGAGAAGTTAATGGATGAATTGGCA

REGION OF ORIGIN OF DNA REPLICATION

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

mRNA START →

[illegible]

CGCTACACGCAGGACGCTTTTTCACGTTCTGGTTGGTTGTGGCCTGTTGATGCTAAAGGTGAGCCGCTTAAAGCTACCAGTTATATGGCT

B START

GTTGGTTTCTATGTGGCTAAATACGTTAACAAAAAGTCAGATATGGACCTTGCTGCTAAAGGTCT[redacted]CTAAAGAATGGAACAACTCA

[illegible]

[illegible]

ATGAGATTGAGGCTGGGAAAAGTTACTGTAGCCGACGTTTTGGCGGCGCAACCTGTGACGACAAATCTGCTCAAATTTATGCGCGCTTCG

B END

[illegible] GAGTCGAAA

C START A END

AATTATCTTGATAAAGCAGGAATTACTACTGCTTGTTTACGAATTAAATCGAAGTGGACTGCTGGC[redacted]AATGAGAAAATTCGACCTAT

CCTTGCGCAGCTCGAGAAGCTCTTACTTTGCGACCTTTCGCCATCAACTAACGATTCTGTCAAAAACTGACGCGTTGGATGAGGAGAAGT

GGCTTAATATGCTTGGCACGTTCGTCAAGGACTGGTTTAGATATGAGTCACATTTTGTTCATGGTAGAGATTCTCTTGTTGACATTTTAA

mRNA START → D START C END

AAGAGCGTGGATTACTATCTGAGTCCGATGCTGTTCAACCACTAAT[redacted]AAGAAATCATGAGTCAAGTTACTGAACAATCCGTACGTTT

[illegible]

E START

AGTTTGGATTGCTACTGACCGCTCTCGTGCTCGTCGCTGCGTT[redacted]CTTGCGTTTATGGTACGCTGGACTTTGTAGGATACCCTCGCTT

[illegible]

[illegible]

E END D END J START

CACTGACGTTCTTACTGACGCAGAAGAAAACGTGCGTCAAAAATTACGTGCGG[redacted]TGATGTAATGTCTAAAGGTAAAAAACGTTCT

GGCGCTCGCCCTGGTCGTCCGCAGCCGTTGCGAGGTACTAAAGGCAAGCGTAAAGGCGCTCGTCTTTGGTATGTAGGTGGTCAACAATTT

J END F START

TAATTGCAGGGGCTTCGGCCCCTTACTTG[redacted]TAAATTATGTCTAATATTCAAACTGGCGCCGAGCGTATGCCGCATGACCTTTCCCAT

CTTGGCTTCCTTGCTGGTCAGATTGGTCGTCTTATTACCATTTCAACTACTCCGGTTATCGCTGGCGACTCCTTCGAGATGGACGCCGTT

[illegible]

[illegible]

[illegible]

GCGCCGTGGATGCCTGACCGTACCGAGGCTAACCCTAATGAGCTTAATCAAGATGATGCTCGTTATGGTTTCCGTTGCTGCCATCTCAAA

[illegible]

GCTGCTTATGCTAATTTGCATACTGACCAAGAACGTGATTACTTCATGCAGCGTTACCATGATGTTATTTCTTCATTTGGAGGTAAAACC

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

F END

TGTGACGTTTATCGCAATCTGCCGACCACTCGCGATTCAATCATGACTTCGTGATAAAAGATTGAGTGTGAGGTTATAACCGAAGCGGTA

G START

AAAATTTTAATTTTTGCCGCTGAGGGGTTGACCAAGCGAAGCGCGGTAGGTTTTCTGCTT[redacted]TTTAATCATGTTTCAGACTTTTATT

TCTCGCCACAATTCAAACTTTTTTTCTGATAAGCTGGTTCTCACTTCTGTTACTCCAGCTTCTTCGGCACCTGTTTTACAGACACCTAAA

GCTACATCGTCAACGTTATATTTTGATAGTTTGACGGTTAATGCTGGTAATGGTGGTTTTCTTCATTGCATTCAGATGGATACATCTGTC

AACGCCGCTAATCAGGTTGTTTCAGTTGGTGCTGATATTGCTTTTGATGCCGACCCTAAATTTTTTGCCTGTTTGGTTCGCTTTGAGTCT

TCTTCGGTTCCGACTACCCTCCCGACTGCCTATGATGTTTATCCTTTGGATGGTCGCCATGATGGTGGTTATTATACCGTCAAGGACTGT

GTGACTATTGACGTCCTTCCCCGTACGCCGGGCAATAACGTCTACGTTGGTTTCATGGTTTGGTCTAACTTTACCGCTACTAAATGCCGC

G END H START

GGATTGGTTTCGCTGAATCAGGTTATTAAAGAGATTATTTGTCTCCAGCCACTTAAGT[redacted]TTATGTTTGGTGCTATTGCTGGCG

GTATTGCTTCTGCTCTTGCTGGTGGCGCCATGTCTAAATTGTTTGGAGGCGGTCAAAAAGCCGCCTCCGGTGGCATTCAAGGTGATGTGC

TTGCTACCGATAACAATACTGTAGGCATGGGTGATGCTGGTATTAAATCTGCCATTCAAGGCTCTAATGTTCCTAACCCTGATGAGGCCG

CCCCTAGTTTTGTTTCTGGTGCTATGGCTAAAGCTGGTAAAGGACTTCTTGAAGGTACGTTGCAGGCTGGCACTTCTGCCGTTTCTGATA

AGTTGCTTGATTTGGTTGGACTTGGTGGCAAGTCTGCCGCTGATAAAGGAAAGGATACTCGTGATTATCTTGCTGCTGCATTTCCTGAGC

TTAATGCTTGGGAGCGTGCTGGTGCTGATGCTTCCTCTGCTGGTATGGTTGACGCCGGATTTGAGAATCAAAAAGAGCTTACTAAAATGC

AACTGGACAATCAGAAAGAGATTGCCGAGATGCAAAATGAGACTCAAAAAGAGATTGCTGGCATTCAGTCGGCGACTTCACGCCAGAATA

CGAAAGACCAGGTATATGCACAAAATGAGATGCTTGCTTATCAACAGAAGGAGTCTACTGCTCGCGTTGCGTCTATTATGGAAAACACCA

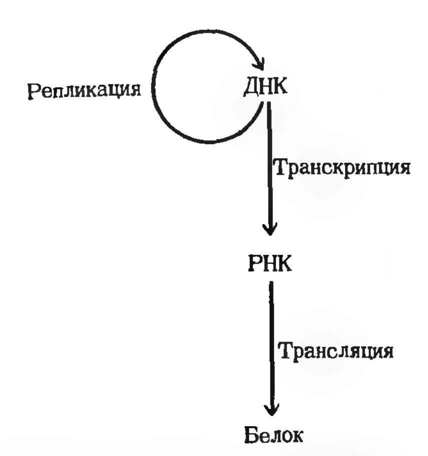
ATCTTTCCAAGCAACAGCAGGTTTCCGAGATTATGCGCCAAATGCTTACTCAAGCTCAAACGGCTGGTCAGTATTTTACCAATGACCAAA

TCAAAGAAATGACTCGCAAGGTTAGTGCTGAGGTTGACTTAGTTCATCAGCAAACGCAGAATCAGCGGTATGGCTCTTCTCATATTGGCG

CTACTGCAAAGGATATTTCTAATGTCGTCACTGATGCTGCTTCTGGTGTGGTTGATATTTTTCATGGTATTGATAAAGCTGTTGCCGATA

H END

CTTGGAACAATTTCTGGAAAGACGGTAAAGCTGATGGTATTGGCTCTAATTTGTCTAGGAAATAA



Центральная догма молекулярной генетики, показывающая перемещение генетической информации в ходе трех фундаментальных процессов: репликации, транскрипции и трансляции. Позже мы увидим, что центральную догму пришлось несколько видоизменить.

нальных единиц генетического материала клеток и вирусов – хромосом и генов. Затем рассмотрим пути и механизмы функционирования чрезвычайно сложных ферментных систем, ответственных за репликацию и транскрипцию ДНК. При этом мы увидим, что биосинтез высокоинформативных молекул ДНК и РНК требует десятков различных ферментов и специализированных белков, в то время как для создания не несущей информации макромолекулы, например гликогена, достаточно всего лишь нескольких ферментов. Далее мы рассмотрим механизм биосинтеза белка, самого сложного из известных биосинтетических процессов, в котором принимает участие больше 200 различных ферментов и других специализированных макромолекул, необходимых для расшифровки и перевода символов генетического кода в трехмерную структуру белков.

Нуклеотидная последовательность ДНК мелкого бактериофага φX174, установленная в 1977 г. Фредериком Сэнгером и его коллегами в Кембридже (Англия). Это достижение знаменовало собой начало новой эры в биохимической генетике и принесло Сэнгеру вторую Нобелевскую премию. За двадцать пять лет до этого Сэнгер опять же первым определил полную аминокислотную последовательность белка – инсулина. После опубликования нуклеотидной последовательности ДНК фага φX174 выяснилось, что она неполная. Было найдено одиннадцать дополнительных нуклеотидов; таким образом, окончательный размер ДНК этого фага равен 5386 нуклеотидным остаткам.

Важным побочным результатом работы Сэнгера было обнаружение в хромосоме фага φX174 перекрывающихся генов и «генов внутри генов»; этот факт был установлен в результате тщательного сравнения нуклеотидной последовательности ДНК с аминокислотной последовательностью кодируемых ею белков. ДНК фага φX174 содержит девять генов, обозначенных A–J. Их «начальные» и «конечные» кодоны обведены рамкой. Обратите внимание, что ген E лежит внутри гена D. Закрашенными прямоугольниками указаны места, узнаваемые рибосомой.

В заключительной главе мы увидим, что хромосомы и гены – это не застывшие, инертные структуры. Они могут подвергаться мутациям, иногда вызывающим серьезные нарушения в биологической функции белка, а иногда приводящим к появлению лучшего по своим функциональным качествам белка. Гены или наборы генов часто претерпевают обмен и рекомбинацию, образуя у потомства новые сочетания свойств. Более того, обмениваются и рекомбинируют части генов, что позволило природе создать удивительно эффективную иммунную систему, которая защищает позвоночных от микробов и помогает сохранить специфические особенности видов.

Эта область биохимии развивается с головокружительной скоростью. Редко проходит месяц без того, чтобы в биохимии не появилось сообщения о каком-нибудь крупном достижении или открытии. За расшифровкой генетического кода в начале 60-х годов последовала нескончаемая вереница захватывающих открытий и обобщений крупного масштаба. Среди них определение нуклеотидных последовательностей многих генов, искусственный синтез генов, соединение генов в новых сочетаниях, встраивание генов одних видов в клетки других видов и получение с помощью таких измененных клеток «продуцентов» многих новых белков, полезных для тех или иных целей. Без преувеличения можно сказать, что в биохимической генетике началась новая эра, которая несомненно окажет в будущем существенное влияние на здоровье и жизнедеятельность человека.

ГЛАВА 27

ДНК: СТРУКТУРА ХРОМОСОМ И ГЕНОВ

Прежде чем приступить к изучению ДНК как хранилища генетической информации, полезно еще раз рассмотреть вопрос о природе информации. Мы уже видели, что информация характеризует степень упорядоченности системы и что в этом смысле она противоположна энтропии, которая характеризует степень беспорядка системы (см. дополнение 14-1); информацию иногда называют поэтому «отрицательной энтропией». Таким образом, информация имеет отношение к энергии. Действительно, информацию можно измерить, т.е. оценить количественно, и связать ее с величинами энтропии и свободной энергии, однако это требует довольно сложного анализа с привлечением понятий вероятности и статистики.

Сегодня, в век электронных калькуляторов и компьютеров, всем известно, насколько они облегчают работу по хранению, переработке и поиску информации. На языке цифровых компьютеров единица информации называется битом (bit, сокращение от англ. слов binary digit -- двоичный разряд). Один бит - это количество информации, необходимое для того, чтобы сделать правильный выбор между двумя альтернативными возможностями. Количество информации, требуемой для того, чтобы сделать два следующих друг за другом выбора между двумя альтернативными возможностями, равно двум битам. Аналогичным образом, для того, чтобы найти одну определенную карту среди 16 карт путем последовательных альтернативных (двоичных) выборов, необходимо четыре бита. Именно таким путем цифровой компьютер может преобразовывать информацию в виде длинного ряда двоичных выборов и как следствие этого составлять различного рода списки, готовить платежные ведомости и даже записывать симфонии.

Однако количество информации, заключенной в одной-единственной клетке человека, все еще намного превышает возможности доступных в настоящее время цифровых компьютеров: человек пока еще не способен выразить в цифрах все многообразие биохимических фактов и взаимосвязей. Двадцать аминокислот, из которых построены все белки, это не просто двадцать кодирующих единиц, ибо значение любой данной аминокислоты в белке может быть различным. Например, значение серина может быть обусловлено тем, что в молекуле этой аминокислоты содержится полярная гидроксильная группа, способная образовывать водородную связь. Оно может быть также связано с тем, что серин входит в качестве важного структурного элемента в состав активного центра фермента (в случае трипсина) или регуляторного центра (в случае гликоген-фосфорилазы) или же быть носителем фосфатных групп (в казеине - белке молока). Перевести четырехбуквенный язык ДНК и двадцатибуквенный язык белков на язык цифр в том случае, когда эти буквы имеют множество значений, пока еще не представляется возможным.

Огромное количество информации, заложенной в ДНК, проще всего, пожалуй, проиллюстрировать, если вернуться на с. 850 к нуклеотидной последовательности ДНК маленького вируса фХ174, со-

держащей 5386 пар оснований, перечень которых занимает одну страницу очень мелкого текста. Чтобы напечатать нуклеотидную последовательность ДНК хромосомы *E. coli*, содержащей 4 млн. пар оснований, потребовалось бы около 740 страниц этой книги. Полная же нуклеотидная последовательность ДНК 46 хромосом клетки человека заняла бы свыше 820 000 страниц, что соответствует 820 томам, каждый размером с весь наш трехтомный учебник. Но этот текст был бы бесполезен без полного знания принципов кодирования и программирования, лежащих в основе процессов транскрипции, трансляции и регуляции экспрессии генов; а это потребовало бы множества дополнительных томов информации.

Перейдем теперь к структуре ДНК, рассмотрим доказательства того, что именно в ДНК хранится генетическая информация, и постараемся понять природу основных функциональных единиц генетического материала - хромосом и генов.

27.1. ДНК и РНК выполняют разные функции

Для начала, чтобы легче было ориентироваться, ознакомимся бегло с природой, функцией и местами локализации основных классов нуклеиновых кислот внутри клеток. ДНК – это чрезвычайно длинные полимерные цепи, состоящие из многих тысяч соединенных друг с другом мономерных единиц – дезоксирибонуклеотидов четырех разных типов, образующих характерные для каждого организма специфические последовательности. Молекулы ДНК обычно состоят из двух цепей. Хромосома прокариотических клеток представляет собой одну очень длинную двухцепочечную молекулу ДНК, собранную в компактное *ядерное образование – нуклеоид.* Напомним, что у прокариот генетический материал не окружен мембраной (разд. 2.4).

Эукариотические клетки содержат большое число молекул ДНК, каждая из которых, как правило, гораздо длиннее единственной молекулы ДНК прокариот. Молекулы ДНК у эукариот связаны с белками и организованы в *хроматиновые волокна* внутри ядра, окруженного сложной двухмембранной системой. Функция ДНК состоит в том, что она хранит запас генетической информации, необходимой для кодирования структуры всех белков и всех РНК каждого вида организма, регулирует во времени и пространстве биосинтез компонентов клеток и тканей, определяет деятельность организма в течение его жизненного цикла и обеспечивает индивидуальность данного организма.

Вирусы (разд. 2.22) также содержат в качестве генетического материала нуклеиновые кислоты – у одних это ДНК, у других РНК (табл. 27-1). Вирусные нуклеиновые кислоты, размер которых мал по сравнению с размером ДНК бактерий,

Таблица 27-1. Некоторые наиболее известные представители вирусов[1)]

Бактериальные вирусы (бактериофаги)	
ДНК-содержащие:	φX174
	λ (лямбда)
	T2
	T4
РНК-содержащие:	f2
	MS2
	R17
	Qβ
Вирусы животных	
ДНК-содержащие:	обезьяний вирус 40 (SV 40)
	вирус мышиной полиомы
	вирус папилломы кролика
	вирус простого герпеса (человек)
	аденовирус (человек)
РНК-содержащие:	вирус саркомы Рауса (птицы)
	вирус полиомиелита
	вирус гриппа
	реовирус (человек)
Растительные вирусы	*(РНК-содержащие):*
	вирус табачной мозаики
	вирус кустистой карликовости томата

[1)] Хозяином всех нижеперечисленных бактериофагов служит *E. coli.*

кодируют специфические белки, обнаруживаемые в вирусных частицах, а также некоторые ферменты, необходимые для репликации вируса в клетке-хозяине.

Молекулы рибонуклеиновых кислот представляют собой длинные полимерные цепи, состоящие из соединенных друг с другом мономерных единиц – рибонуклеотидов. По размеру молекулы РНК гораздо короче, чем ДНК, однако их общее количество в большинстве клеток значительно превышает количество ДНК. Как в прокариотических, так и в эукариотических клетках содержится РНК трех основных классов: *матричная РНК (мРНК)*, *рибосомная РНК (рРНК)* и *транспортная РНК (тРНК)*. Любая РНК в отличие от ДНК представляет собой одноцепочечный полирибонуклеотид, для которого характерны строго определенная молекулярная масса, специфическая нуклеотидная последовательность и определенная биологическая функция (табл. 27-2). Матричные РНК (мРНК) служат матрицами, которые используются рибосомами при переводе генетической информации в аминокислотную последовательность белков. Нуклеотидная последовательность мРНК комплементарна генетическому сообщению, содержащемуся в определенном участке кодирующей цепи ДНК. В одной эукариотической клетке может находиться больше 10^4 различных молекул мРНК, каждая из которых кодирует одну или несколько разных полипептидных цепей.

тРНК так же, как и мРНК, представляют собой одноцепочечные полирибонуклеотиды, образующие компактные, свернутые определенным образом структуры. Молекулы тРНК состоят из 70–95 рибонуклеотидов, их мол. массы лежат в пределах 23000–30000. Каждой из 20 аминокислот, обнаруживаемых в белках, соответствует одна или несколько тРНК, которые связывают ее, переносят к рибосомам и служат «адаптором» при переводе закодированного в мРНК генетического текста в аминокислотную последовательность белков. Каждая тРНК содержит особый тринуклеотид (триплет), называемый ее *антикодоном*, который комплементарен тринуклеотидной последовательности (триплету) в мРНК – *кодону*, кодирующему аминокислоту, соответствующую данной тРНК.

Рибосомные РНК (рРНК) – основные компоненты рибосом; они составляют до 65% их веса. В прокариотических рибосомах присутствует три вида рРНК (табл. 27-2), а эукариотические рибосомы, как мы увидим в гл. 29, содержат четыре вида рРНК. рРНК играют важную роль в структуре и биосинтетической функции рибосом.

В эукариотических клетках существует два дополнительных класса РНК: *гетерогенные ядерные РНК (гяРНК)*, представляющие собой ядерные предшественники мРНК, и *малые (низкомолекулярные) ядерные РНК* (мяРНК), участвующие в процессинге РНК.

Таблица 27-2. Свойства различных РНК *E. coli*

Класс	Скорость седиментации, S[1]	Молекулярная масса	Приблизительное число нуклеотидных остатков	Процент общего содержания РНК в клетке
мРНК	6–25	25000–1000000	75–300	~2
тРНК	~4	23000–30000	73–93	16
рРНК	5	~35000	~100	82
	16	~550000	~1500	
	23	~1100000	~3100	

[1] Символ S означает «сведберг» – единицу, характеризующую скорость седиментации макромолекулы при центрифугировании, которая зависит от размера и формы молекулы. Единица названа в честь Сведберга, шведского физикохимика – изобретателя ультрацентрифуги.

Рассмотрим теперь структуру нуклеиновых кислот более подробно, начиная с их строительных блоков – *нуклеотидов.*

27.2. Нуклеотидные единицы ДНК и РНК содержат специфические основания и пентозы

Напомним (гл. 3), что нуклеотиды состоят из трех компонентов – азотистого основания, пентозы и фосфорной кислоты, соединенных (рис. 27-1) так, что основание связано N-гликозидной связью с 1′-углеродом пентозы, а фосфорная кислота – сложноэфирной связью с 5′-углеродом пентозы. Азотистые основания представляют собой производные двух исходных гетероциклических соединений – пиримидина и пурина (рис. 27-2). ДНК содержит два пиримидиновых основания – *цитозин* (С) и *тимин* (Т) и два пуриновых основания – *аденин* (А) и *гуанин* (G). В состав РНК также входят два пиримидина – *цитозин* (С) и *урацил* (U) и два пурина – *аденин* (А) и *гуанин* (G). Единственное важное различие ДНК и РНК по основаниям заключается в том, что тимин – один из основных пиримидинов ДНК – встречается очень редко в РНК; и, наоборот, урацил – один из главных пиримидинов РНК – крайне редко встречается в ДНК. Пиримидиновые и пуриновые основания – это почти плоские молекулы, сравнительно плохо растворимые в воде (рис. 27-3).

В нуклеиновых кислотах найдено два типа пентоз. Повторяющиеся дезоксирибонуклеотидные единицы ДНК содержат *2′-дезокси-D-рибозу*, а рибонуклеотидные единицы РНК содержат *D-рибозу*. Обе пентозы представлены в нуклеотидах в β-фуранозной форме.

На рис. 27-4 приведены структурные формулы и названия четырех основных дезоксирибонуклеотидов (дезоксирибонуклеозид-5′-монофосфатов), функционирующих как структурные и кодирующие единицы ДНК, и четырех основных рибонуклеотидов (рибонуклеозид-5′-моно-

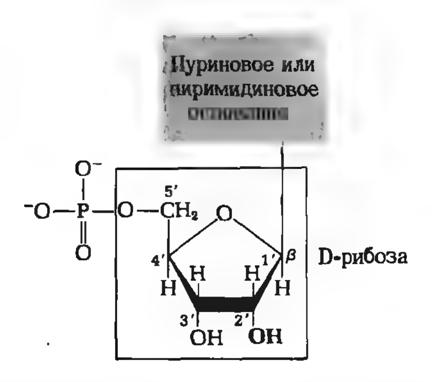


Рис. 27-1. Обобщенная структура нуклеотидов. На рисунке приведена структура рибонуклеотида. В дезоксирибонуклеотидах —ОН-группа (обозвачена красным цветом) заменена атомом —Н. Атомы углерода пентозы пронумерованы цифрами со штрихами (1′, 2′ и т. д.), чтобы отличать их от атомов в основаниях.

	ДНК	РНК
Пурины	Аденин	Аденин
	Гуанин	Гуанин
Пиримидины	Цитозин	Цитозин
	Тимин	Урацил

Рис. 27-2. Главные пиримидиновые и пуриновые основания в ДНК и РНК.

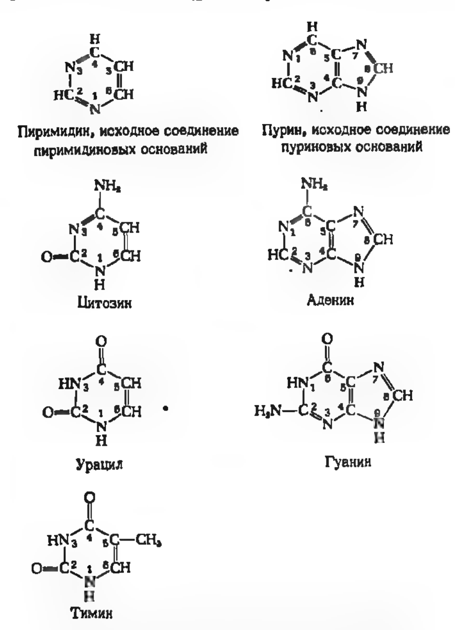


Рис. 27-3. Исходные соединения – пиримидин и пурин, а также главные пиримидиновые и пуриновые основания нуклеиновых кислот.

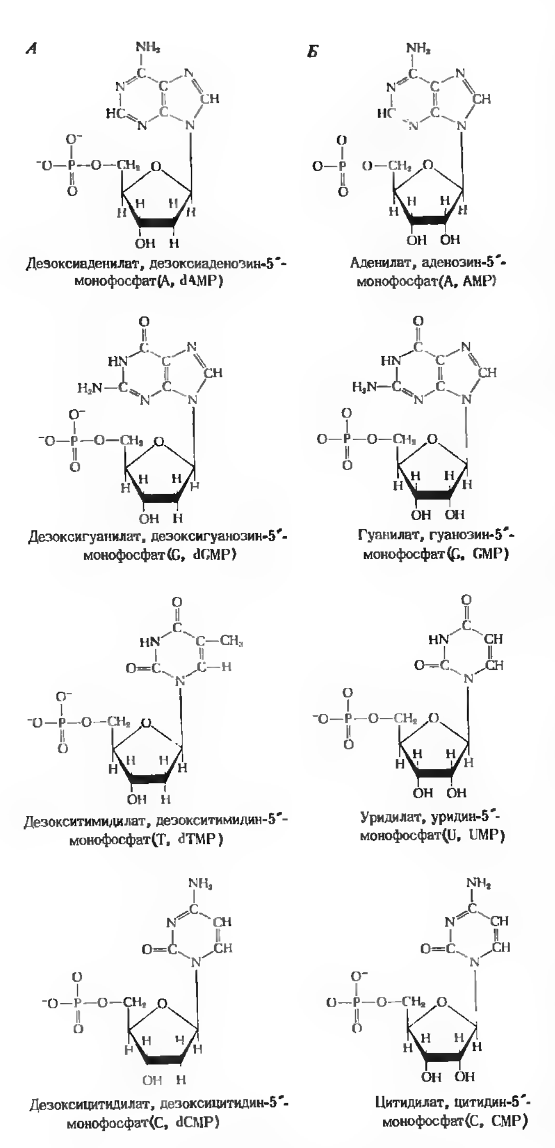


Рис. 27-4. *А*. Дезоксирибонуклеотидные компоненты ДНК в свободной форме при pH 7,0. Их обычно обозначают A, G, T и C (или реже dA, dG, dT и dC), если они находятся в составе молекулы ДНК, и dAMP, dGMP, dTMP и dCMP, если эти нуклеотиды присутствуют в свободной форме. *Б*. Рибонуклеотидные компоненты РНК. В обоих случаях фосфатная группа находится в 5'-положении.

фосфатов)–кодирующих единиц РНК. Специфические длинные последовательности оснований A, T, G и C в ДНК кодируют генетическую информацию. Кроме главных оснований в ДНК содержится также небольшое число так называемых *минорных оснований*. Обычно минорные основания–это метилированные формы главных оснований, однако в ряде вирусных ДНК некоторые основания могут быть гидроксиметилированы или глюкозилированы. Такие измененные или необычные основания в молекулах ДНК во многих случаях представляют собой специфические сигналы, которые играют важную роль в реализации генетической информации или в обеспечении ее сохранности. Минорные основания были обнаружены также в РНК, в основном в тРНК.

27.3. Следующие друг за другом нуклеотиды соединены фосфодиэфирными связями

Последовательно расположенные нуклеотиды в молекулах ДНК и РНК ковалентно связаны друг с другом при помощи фосфатных «мостиков». 5'-гидроксильная группа пентозы одного нуклеотида присоединена к 3'-гидроксильной группе пентозы соседнего нуклеотида с помощью *фосфодиэфирной связи* (рис. 27-5). Таким образом, ковалентные остовы нуклеиновых кислот состоят из монотонно чередующихся фосфатных и пентозных групп; основания же можно рассматривать как боковые группы, присоединенные к остову на равных расстояниях друг от друга. Отметим также, что сахарофосфатный остов и ДНК, и РНК несет заряд, поскольку фосфатные группы являются кислыми и при характерных для клеток pH заряжены отрицательно. Вместе с тем пуриновые и пиримидиновые основания, которые плохо растворимы в воде, гидрофобны. Укажем также, что цепи ДНК и РНК обладают определенной полярностью, или направлением, поскольку все межнуклеотидные фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепи одинаково (рис. 27-5). Благодаря этой полярности каждая полинуклеотидная цепь имеет 5'-конец и 3'-конец.

Последовательность нуклеотидов в ну-

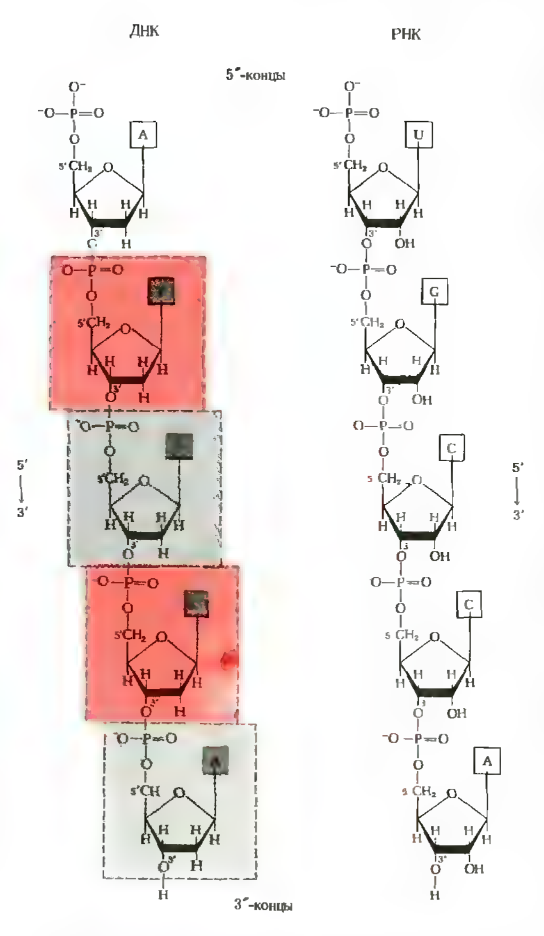


Рис. 27-5. Структура ковалентного остова ДНК и РНК, в которой следующие друг за другом нуклеотидные единицы (в ДНК эти нуклеотидные единицы закрашены) соединяются между собой фосфодиэфирными мостиками. Обратите внимание на то, что остов, состоящий из чередующихся остатков пентозы и фосфатных групп, представляет собой сильно полярную часть молекулы, тогда как основания – это неполярные, гидрофобные компоненты молекулы.

клеиновых кислотах можно схематически изобразить так, как показано ниже на примере фрагмента ДНК, состоящего из пяти нуклеотидов:

5′ → 3′

Основания обозначены символами A, T, G и C, каждая дезоксирибоза изображена вертикальной чертой, а фосфатные группы – символом (P). Цифрами в кружках указаны места в дезоксирибозе, к которым присоединены фосфатные группы. Структуру одиночной цепи ДНК изображают всегда так, что слева располагается 5′-конец, а справа – 3′-конец, т.е. в направлении 5′ → 3′. Приведенный выше пентадезоксирибонуклеотид можно записать следующим образом:

pApTpGpCpA или еще короче pATGCA.

Межнуклеотидные связи в ДНК и РНК можно химически расщепить с помощью гидролиза. Их можно гидролизовать и ферментами, которые называются *нуклеазами*. Некоторые нуклеазы способны расщеплять связи между двумя соседними нуклеотидами, расположенными внутри цепи ДНК или РНК; такие нуклеазы называют *эндонуклеазами*. Нуклеазы другого класса могут катализировать гидролиз только связи концевого нуклеотида – или у 5′- или у 3′-конца молекулы; эти ферменты относятся к *экзонуклеазам*. *Дезоксирибонуклеазы*, специфически расщепляющие определенные межнуклеотидные связи в ДНК, и *рибонуклеазы* – ферменты, специфичные к РНК, найдены во всех живых клетках. Они секретируются, в частности, поджелудочной железой в кишечный тракт, где принимают участие в гидролизе нуклеиновых кислот в процессе пищеварения. Ниже мы увидим, что различные типы эндонуклеаз представляют собой важный биохимический инструмент для контролируемого расщепления ДНК и РНК на меньшие фрагменты при определении их нуклеотидной последовательности.

27.4. ДНК хранит генетическую информацию

История ДНК начинается с Фридриха Мишера, швейцарского биолога, который первым провел систематическое исследование клеточного ядра. В 1868 г. Мишер выделил из ядер клеток гноя, полученного с использованных хирургических повязок, вещество, содержащее фос-

фор, которое было названо им нуклеином. (Клетки гноя – это белые кровяные клетки, или лейкоциты.) Мишер обнаружил, что нуклеин содержит кислый компонент, который известен теперь как ДНК, и основной компонент, который соответствует белку. Позже он нашел сходное вещество в головках сперматозоидов лосося. Несмотря на то что Мишер отделил фракцию нуклеиновой кислоты и изучал ее свойства, ковалентная структура ДНК, показанная на рис. 27-5, оставалась невыясненной вплоть до конца 40-х годов.

Еще Мишер, а вслед за ним многие другие исследователи предполагали, что нуклеин или нуклеиновая кислота имеют какое-то отношение к клеточной наследственности, однако первое прямое доказательство того, что ДНК – носитель генетической информации, было получено только в 1943 г. в результате открытия, сделанного Освальдом Т. Эвери, Колином Мак-Леодом и Маклином Мак-Карти из Рокфеллеровского института. Они обнаружили, что ДНК, экстрагированная из вирулентного (болезнетворного) штамма бактерии *Streptomyces pneumoniae*, известного также как пневмококк, неизменно переводила невирулентный штамм этой бактерии в вирулентную форму (рис. 27-6). Эвери и его коллеги сделали вывод, что ДНК, выделенная из вирулентного штамма, несет наследуемую генетическую информацию, обусловливающую вирулентность, и что эта информация неизменно включается в ДНК реципиентных невирулентных клеток. На первых порах не все согласились с таким утверждением. Некоторые критики считали, что действительным носителем генетической информации могли служить следовые количества содержащихся в ДНК белковых примесей. Эта возможность была вскоре исключена, так как оказалось, что обработка ДНК дезокси-

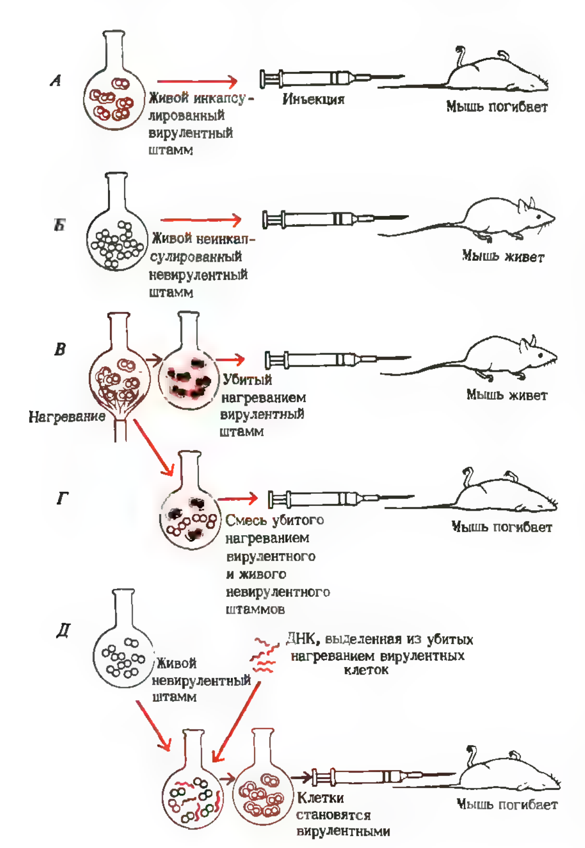


Рис. 27-6. Эксперимент Эвери, Мак-Леода и Мак-Карти. Заражение мышей инкапсулированным штаммом пневмококка (*А*) вызывает смерть животных, в то время как бескапсульный (*Б*) и убитый нагреванием инкапсулированный штаммы (*В*) безвредны. *Г*. Ранее бактериолог Фредерик Гриффит показал, что при добавлении убитых нагреванием вирулентных пневмококков (которые сами по себе для мышей безвредны) к живым невирулентным клеткам последние неизменно превращались в вирулентные инкапсулированные клетки. Он сделал вывод, что в убитых нагреванием вирулентных клетках присутствует некий трансформирующий фактор, который попадает в живые невирулентные клетки и придает им вирулентность и способность образовывать капсулы. Эвери и его коллеги установили, что этот трансформирующий фактор представляет собой ДНК. *Д*. Они выделили ДНК из убитых нагреванием вирулентных пневмококков, очистили ее от белков, насколько это было возможно, и добавили к невирулентным клеткам. При этом невирулентные пневмококки превратились в вирулентные. Очевидно, ДНК попала в невирулентные клетки, и гены, ответственные за вирулентность и образование капсулы, встроились в хромосомы невирулентных клеток.

рибонуклеазами уничтожает трансформирующую активность, а протеолитические ферменты на нее не влияют.

Позже, в другом важном эксперименте, было получено независимое свидетельство в пользу того, что генетическую информацию несет ДНК. В 1952 г. Альфред Д. Херши и Марта Чейз в опытах с применением радиоактивных меток показали, что при инфекции бактериофагом Т2 его клетки-хозяина *E. coli* именно ДНК вирусной частицы Т2, а не ее белковая часть попадает внутрь бактериальной клетки и доставляет туда генетическую информацию для репликации этого вируса (рис. 27-7).

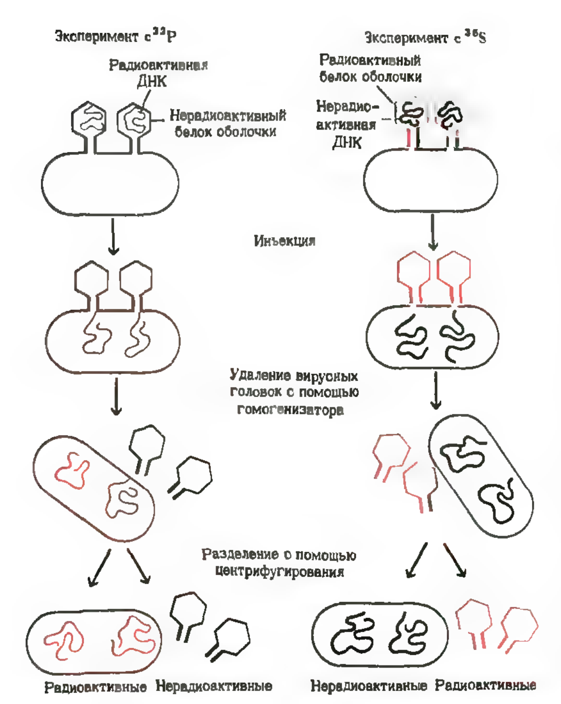


Рис. 27-7. Общая схема эксперимента Херши и Чейз. Эксперимент проводили на двух препаратах бактериофага, меченного радиоактивным изотопом. В одном из них с помощью изотопа ^{32}P были помечены фосфатные группы фаговой ДНК, а в другом изотоп ^{35}S был введен в серусодержащие аминокислоты белка оболочки фага. Каждый из меченных таким способом фагов по отдельности был добавлен к суспензии немеченых бактерий. Затем обе группы зараженных фагом бактериальных клеток встряхивали в смесителе. Оказалось, что клетки, зараженные ^{32}P-вирусными частицами, содержат в своем составе ^{32}P, т. е. в них попала меченая вирусная ДНК. Отделенные от клеток «тени» фага (пустые оболочки вируса) радиоактивности не содержали. В клетках, зараженных ^{35}S-вирусными частицами, радиоактивности не было, зато она была найдена в «тенях» фага после отделения их от клеток с помощью смесителя. Поскольку в обоих случаях было получено потомство вирусных частиц, данный эксперимент доказал, что генетическая информация, необходимая для репликации вируса, переносится вирусной ДНК, а не вирусным белком.

В результате этих важных ранних экспериментов и множества других доказательств, полученных позже, в настоящее время с полной уверенностью можно считать, что именно ДНК является той составной частью хромосом, которая несет в себе генетическую информацию живых клеток.

27.5. ДНК разных видов имеет различный нуклеотидный состав

Самым важным ключом к разгадке структуры ДНК стало открытие, сделанное в конце 40-х годов Эрвином Чаргаффом и его коллегами из Колумбийского университета. Они обнаружили, что четыре основания встречаются в ДНК разных организмов в различных соотношениях и что между основаниями существует определенная количественная связь. В табл. 27-3 представлены количественные соотношения четырех оснований (A, T, G и C) в препаратах ДНК, выделенных из разных видов живых организмов. Такого рода результаты, полученные для препаратов ДНК, выделенных из огромного множества различных видов, привели Чаргаффа и более поздних исследователей к следующим выводам:

1. Препараты ДНК, выделенные из разных тканей одного и того же вида организма, имеют одинаковый нуклеотидный состав.

Таблица 27-3. Соотношение оснований в ДНК[1)]

Организм	Нуклеотидный состав, мол. %				Соотношения оснований		
	A	G	C	T	A/T	G/C	Пурины / Пиримидины
Человек	30,9	19,9	19,8	29,4	1,05	1,00	1,04
Овца	29,3	21,4	21,0	28,3	1,03	1,02	1,03
Курица	28,8	20,5	21,5	29,3	1,02	0,95	0,97
Черепаха	29,7	22,0	21,3	27,9	1,05	1.03	1,05
Лосось	29,7	20,8	20,4	29,1	1,02	1,02	1,02
Морской еж	32,8	17,7	17,3	32,1	1,02	1,02	1,02
Саранча	29,3	20,5	20,7	29,3	1,00	1,00	1,00
Проросток пшеницы	27,3	22,7	22,8	27,1	1,01	1,00	1,00
Дрожжи	31,3	18,7	17,1	32,9	0,95	1,09	1,00
E. coli	24,7	26,0	25,7	23,6	1,04	1,01	1,03
Staphylococcus aureus	30,8	21,0	19,0	29,2	1,05	1,11	1,07
Фаг Т7	26,0	24.0	24,0	26,0	1,00	1,00	1,00
Фаг λ	21,3	28,6	27,2	22,9	0,92	1,05	1,00
Фаг φX174 (репликативная форма)	26,3	22,3	22,3	26.4	1.00	1.00	1,00

[1)] Обратите внимание на то, что нуклеотидные составы ДНК человека и бактерии *S. aureus* почти одинаковы. Каждому виду соответствует определенный нуклеотидный состав ДНК, причем у разных видов различия в нуклеотидном составе могут быть очень незначительными.

2. Нуклеотидный состав ДНК у разных видов различен.

3. Нуклеотидный состав ДНК у данного вида не меняется с возрастом организма, не зависит от его питания и от изменений окружающей его среды.

4. Число адениновых остатков в любой ДНК независимо от вида организма равно числу тиминовых остатков (т. е. A = T), а число гуаниновых остатков всегда равно числу цитозиновых остатков (G = C). Из этих соотношений следует, что сумма пуриновых остатков равна сумме пиримидиновых остатков, т. е. A + G = T + C.

Эти количественные соотношения, подтвержденные позже многими исследователями, не только стали важной предпосылкой при установлении трехмерной структуры ДНК, но и помогли понять, каким образом генетическая информация кодируется в ДНК и передается от одного поколения другому.

27.6. Уотсон и Крик постулировали модель двойной спирали ДНК

Мы уже видели, как с помощью в высшей степени эффективного метода рентгеноструктурного анализа, основанного на исследовании дифракции рентгеновских лучей. удалось выяснить структуру фибриллярных и глобулярных белков (гл. 7 и 8). При рентгеноструктурном анализе волокон ДНК Розалинд Франклин и Морис Уилкинс получили характерную дифракционную картину (рис. 27-8). На основании этой рентгенограммы был сделан вывод о том, что для полимерных цепей ДНК характерны два типа периодичности вдоль длинной оси: 0,34 и 3,4 нм. Проблема состояла в том, чтобы построить трехмерную модель молекулы ДНК, которая могла бы объяснить не только наличие этих периодичностей, но также открытые Чаргаффом специфические соотношения оснований (A = T и G = C).

В 1953 г. американский генетик Джеймс Уотсон и английский физик

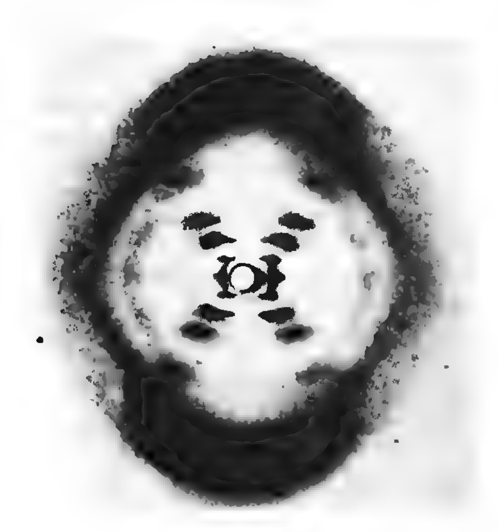


Рис. 27-8. Рентгенограмма ДНК. Крестообразное расположение рефлексов указывает на спиральную структуру молекулы. Сильно затемненные зоны в верхней и нижней частях фотографии соответствуют следующим друг за другом основаниям ДНК.



Рис. 27-9. Уотсон и Крик у одной из своих моделей ДНК (фотография сделана в 1953 г.).

Рис. 27-10. Предложенная Уотсоном и Криком модель структуры ДНК. *А*. Пространственная проволочная модель. *Б*. Пространственная модель, в которой отражены объемы атомов.

Фрэнсис Крик как результат своих работ в Кембриджском университете предложили трехмерную модель ДНК, которая объясняла как данные рентгеноструктурного анализа, так и характерную для ДНК парность оснований (рис. 27-10). Модель состоит из двух цепей ДНК, за-

0,34 нм

3,4 нм

2,0 нм

А

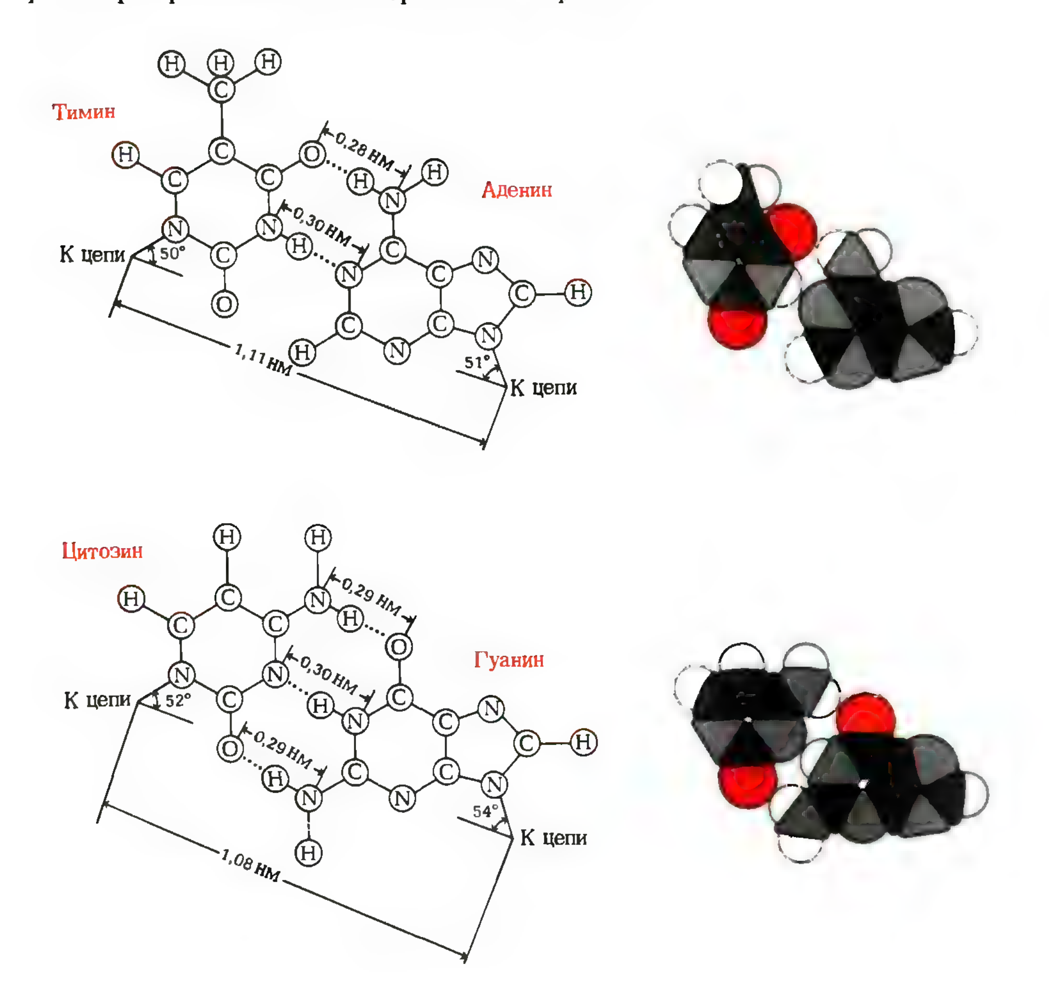
Большая, или глубокая, бороздка

Малая, или мелкая, бороздка

Б

крученных в спираль вправо вокруг одной и той же оси с образованием двойной спирали. Две цепи в этой спирали антипараллельны, т. е. их 5', 3'-межнуклеотидные фосфодиэфирные мостики направлены в противоположные стороны. Гидрофильные остовы цепей, состоящие из чередующихся остатков дезоксирибозы и отрицательно заряженных фосфатных групп, расположены на внешней стороне двойной спирали и обращены в сторону окружающей ее воды. Гидрофобные пуриновые и пиримидиновые основания обеих цепей уложены стопкой внутри двойной спирали, так что практически плоские молекулы оснований сближены между собой и расположены перпендикулярно длинной оси двойной спирали. Пространственное взаиморасположение цепей приводит к возникновению *большой* и *малой бороздок*. Основания одной цепи спарены с находящимися в той же плоскости основаниями другой цепи. Внутри этой структуры точно пригнанными оказываются только определенные пары оснований. Такими соответствующими друг другу парами всегда являются пары пурин-пиримидин, а именно пары А–Т и G–C, т. е. те самые пары, которые образованы основаниями,

Рис. 27-11. Выполненные в масштабе структурные формулы и пространственные модели соединенных водородными связями оснований в парах аденин–тимин и гуанин–цитозин. Первая из этих пар образована с помощью двух водородных связей, вторая – с помощью трех водородных связей. Пары G–C организованы в пространстве несколько более компактно, чем пары А–Т.



встречающимися в препаратах ДНК, как это показал Чаргафф, в эквивалентных количествах (табл. 27-3). Более того, основания каждой пары настолько сближены, что между ними возникают водородные связи. Как образуются водородные связи между аденином и тимином и между гуанином и цитозином, показано на рис. 27-11. Важно отметить, что между G и C возникают три водородные связи (G≡C), а между A и T – только две (A=T). Другие пары оснований не вписываются в структуру двойной спирали. Пара оснований, составленная из двух пуринов (A и G), слишком велика, чтобы поместиться внутри спирали, имеющей данные параметры, а основания в паре C—T расположены слишком далеко друг от друга, чтобы образовать стабильные водородные связи. Кроме того, при сохранении своего положения в спирали A не может образовать водородные связи с C, а G – с T.

Чтобы объяснить наблюдавшиеся при рентгеноструктурном анализе периодичности, Уотсон и Крик показали с помощью молекулярных моделей, что стопкообразно уложенные внутри двойной спирали основания должны располагаться на расстояниях 0,34 нм друг от друга. Из этих моделей также следовало, что другую периодичность, а именно 3,4 нм можно объяснить тем, что на каждый полный оборот двойной спирали приходится около 10 нуклеотидных остатков (рис. 27-10). Диаметр двойной спирали составляет приблизительно 2 нм. Очень важно обратить внимание на то, что две антипареллельные полинуклеотидные цепи двойной спирали ДНК не идентичны ни по последовательности оснований, ни по нуклеотидному составу, как можно видеть на рис. 27-12. Однако они *комплементарны* друг другу. Где бы ни появился в одной цепи аденин, напротив него в другой цепи обязательно обнаруживается тимин; точно так же если в одной цепи находится гуанин, то напротив него в другой цепи обязательно присутствует цитозин.

Цепи, образующие двойную спираль ДНК (или *дуплекс*, как часто называют

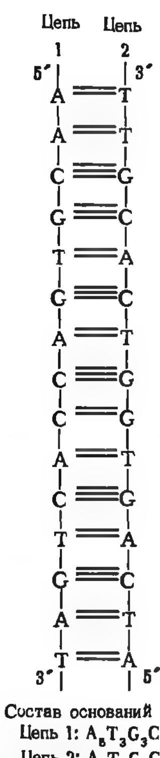


Рис. 27-12. Схематическое изображение комплементарных антипараллельных цепей ДНК согласно модели Уотсона и Крика. Обратите внимание, что цепи отличаются друг от друга по составу оснований, а также по последовательности, если каждую цепь читать в направлении 5′ → 3′. Отметьте, что соблюдаются равенства, A = T и G = C.

двойную спираль), удерживаются друг около друга за счет водородных связей между комплементарными основаниями (рис. 27-11) и гидрофобных взаимодействий, благодаря которым уложенные в стопку основания оказываются в значительной степени спрятанными внутрь двойной спирали и защищенными от воды, а сильно полярные остовы полимерных цепей располагаются снаружи и становятся доступными воде. Основной вклад в поддержание стабильности двойной спирали, так же, как в случае третичной структуры глобулярных белков (разд. 8.6), вносят гидрофобные взаимодействия. Отметим, что при pH 7 все фосфатные группы в полярных остовах двойной спирали ионизованы и заря-

жены отрицательно, так что ДНК представляет собой сильную кислоту.

Многочисленные данные – и химические, и биологические – свидетельствуют о том, что модель двойной спирали ДНК в основном правильна. Теперь посмотрим, как эта структура обеспечивает точное воспроизведение генетической информации.

27.7. Нуклеотидная последовательность ДНК выполняет функцию матрицы

Молекулы ДНК представляют собой длинные полимерные цепи, имеющие специфические последовательности четырех главных оснований А, Т, G и С, которые являются символами, предназначенными для кодирования генетической информации. Поэтому мы говорим, что нуклеотидная последовательность в ДНК служит *матрицей* при репликации ДНК. Однако важно понять, почему для точной репликации, транскрипции и трансляции генетической информации нам необходимы матрицы.

При биосинтезе неинформационной макромолекулы гликогена, которая состоит из повторяющихся единиц только одного типа – D-глюкозы, тождественность и чистота конечного продукта обеспечиваются активным центром гликоген-синтазы (разд. 20.13). Для этого фермента характерна субстратная специфичность, т. е. его активный центр способен присоединять только молекулу UDP-глюкозы и нередуцирующий конец цепи молекулы гликогена, которая должна быть удлинена. В принципе активный центр этого фермента (как, впрочем, и всех других ферментов) можно рассматривать как матрицу (это слово означает «шаблон» или «форму»), поскольку между молекулой (или молекулами) субстрата и активным центром осуществляется комплементарная «подгонка».

В случае ДНК, РНК и полипептидов только один активный центр фермента не в состоянии обеспечить специфическую последовательность кодирующих единиц. Активные центры ферментов сравнительно малы и могут связывать одновременно лишь одну или несколько молекул, играющих роль строительных блоков, в таком положении, чтобы обеспечить их точную сборку в правильной последовательности. Нуклеиновые же кислоты, содержащие в своем составе тысячи или миллионы нуклеотидных единиц, настолько велики, что размеры активных центров ферментов оказываются просто недостаточными для того, чтобы точно определять полную последовательность, в которой должны быть собраны нуклеотидные единицы. Следовательно, матрицей для формирования нуклеотидной последовательности своего комплементарного партнера должна служить одна цепь ДНК.

Другой аспект гипотезы Уотсона – Крика состоит в том, что структура двойной спирали ДНК указывает способ, с помощью которого может быть точно воспроизведена содержащаяся в ДНК генетическая информация (рис. 27-13). Поскольку две цепи двойной спирали ДНК структурно комплементарны, их нуклеотидные последовательности несут комплементарную друг по отношению к другу информацию. Уотсон и Крик постулировали, что репликация ДНК в ходе деления клеток начинается с разделения двух цепей, каждая из которых становится матрицей, определяющей нуклеотидную последовательность новой комплементарной цепи, образуемой с помощью репликативных ферментов. Была высказана мысль, что правильность репликации каждой из цепей ДНК должна обеспечиваться точным соответствием и стабильностью комплементарных пар оснований A=T и G≡C в двух дочерних дуплексах, каждый из которых содержит одну цепь родительской ДНК и новую цепь, комплементарную этой родительской цепи. Было постулировано также, что каждая вновь образованная дочерняя двойная спираль попадает в дочернюю клетку без каких-либо изменений. В гл. 28 мы увидим, как эта гипотеза была экспериментально подтверждена.

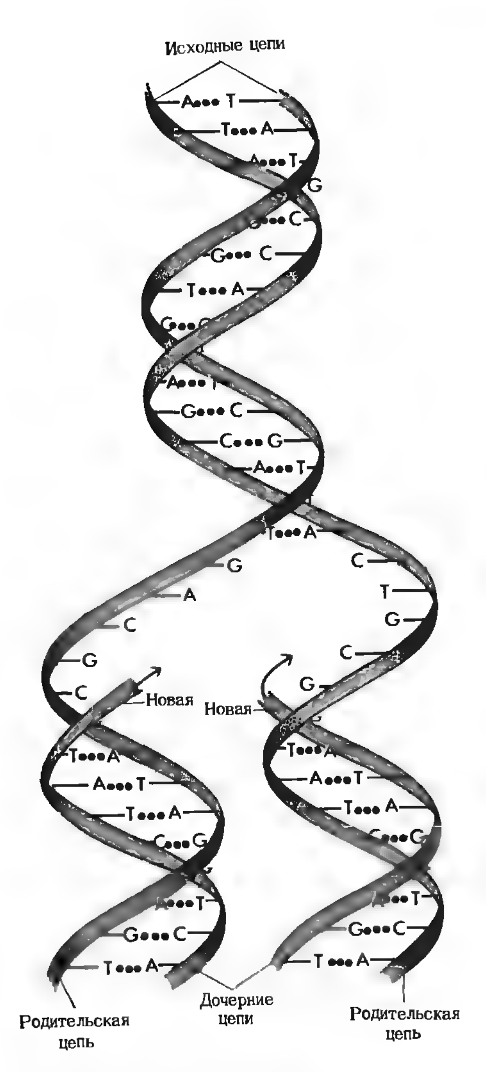


Рис. 27-13. Модель репликации ДНК, предложенная Уотсоном и Криком. Комплементарные цепи родительской ДНК разделяются, и каждая из них служит матрицей для биосинтеза комплементарной дочерней цепи (дочерние цепи показаны красным цветом).

27.8. Двойные спирали ДНК могут подвергаться денатурации, т. е. расплетаться

Рассмотрим теперь некоторые химические и физические свойства ДНК, вытекающие из ее структуры двойной спирали. Растворы ДНК, выделенной с большими предосторожностями, обладают при pH 7,0 и комнатной температуре (20–25°C) высокой вязкостью. Если такой раствор нагреть до температуры выше 80–90°C или довести его pH до экстремальных значений, то вязкость раствора резко упадет, что указывает на изменение физического состояния ДНК. Мы уже видели, что высокая температура и экстремальные значения pH приводят к денатурации, или раскручиванию глобулярных белков (разд. 6.12). Точно так же высокие температуры и экстремальные значения pH вызывают денатурацию, или расплетание, двухцепочечных спиралей ДНК, разрушая водородные связи между спаренными основаниями и гидрофобные взаимодействия, с помощью которых удерживались вместе уложенные в стопку основания. В результате двойная спираль расплетается с образованием хаотических, беспорядочных одноцепочечных клубков до тех пор, пока обе цепи, наконец, не разделятся полностью. При денатурации (ее называют также *плавлением*) ковалентные связи в остове молекулы не разрываются (рис. 27-14).

Если оставшийся нерасплетенным двухцепочечный фрагмент ДНК, состоящий из десятка или большего числа комплементарных нуклеотидов, все еще продолжает удерживать цепи от полного расхождения, то процесс денатурации может быть легко обращен. Это значит, что при приведении температуры и величины pH вновь к физиологическим значениям расплетенные участки двух цепей самопроизвольно сплетутся, образуя исходный дуплекс (отжиг, рис. 27-14). Однако если расхождение цепей полностью завершено, то ренатурация будет происходить в два этапа. Первый из них протекает сравнительно медленно, поскольку две цепи должны «отыскать» друг друга в ходе случайных столкновений и образовать короткие комплементарные участки двойной спирали. Второй этап осуществляется гораздо быстрее, так как остальные основания последовательно состыковываются и образуют пары комплементарных оснований. Затем две цепи «застегиваются» наподобие молнии, вновь образуя двойную спираль.

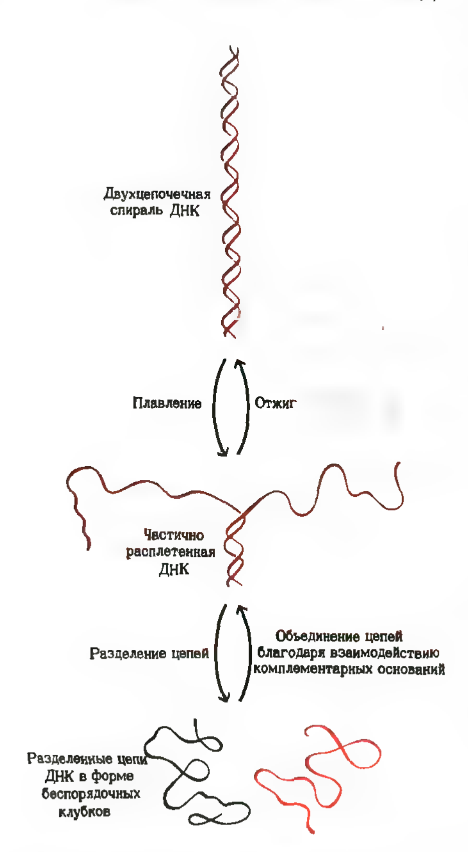


Рис. 27-14. Этапы обратимой денатурации и ренатурации ДНК.

27.9. Цепи ДНК из двух разных видов могут образовать гибриды ДНК–ДНК

Если дуплексы ДНК, выделенные из клеток человека и мыши, денатурировать нагреванием по отдельности, а затем смешать и выдерживать при 65°С в течение многих часов, то бóльшая часть цепей мышиной ДНК «отжигается» с комплементарными цепями мышиной ДНК с образованием исходного дуплекса; аналогичным образом большинство цепей ДНК человека воссоединяется с комплементарными цепями ДНК человека. Однако наряду с этим некоторое число одиночных цепей ДНК мыши будет связываться с одиночными цепями ДНК человека, в результате чего появляются *гибридные дуплексы*, в которых отдельные участки цепей ДНК мыши образуют двухцепочечные области с участками цепей ДНК человека. Спаривание оснований происходит лишь между некоторыми участками цепей ДНК человека и мыши; остальные основания не способны образовывать комплементарные пары. Гибридные дуплексы возникают только при условии, что между ДНК двух разных видов существует некоторое сходство в нуклеотидных последовательностях. Чем ближе родство двух видов, тем в большей степени их ДНК будут образовывать гибриды. Например, ДНК человека гораздо лучше образует гибриды с ДНК мыши, чем с ДНК дрожжей.

Гибридизационные тесты (рис. 27-15) представляют собой очень эффективное средство изучения многих аспектов биохимической генетики. С их помощью можно не только определять, насколько близки два вида, но и устанавливать связь данной ДНК с какой-нибудь РНК, проводя ДНК–РНК-гибридизацию. Кроме того, гибридизацию применяют для выделения и очистки генов и РНК.

27.10. Некоторые физические свойства двухцепочечных ДНК отражают соотношение в их составе пар G≡C и A=T

Если медленно нагревать растворы вирусной или бактериальной ДНК, то их молекулы денатурируют при вполне определенных температурах (рис. 27-16). Переход от нативного дуплекса ДНК к расплетенной беспорядочно скрученной денатурированной форме можно обнаружить по увеличению поглощения ультрафиолетового света или по уменьшению вязкости раствора ДНК. Для каждого вида ДНК характерна своя температура денатурации, называемая «точкой плавления». Чем выше содержание в ДНК пар G≡C, тем выше точка плавления этой ДНК. Это объясняется тем, что пары G≡C более стабильны и на их диссоциацию требуется больше энергии, чем на разрушение пар A=T; отчасти это обусловлено тем, что пары G≡C соединены тремя водородными связями, а пары A=T – лишь двумя. Тщательное опреде-

ление точки плавления препарата ДНК при фиксированных условиях pH и ионной силы может дать, следовательно, информацию о соотношении пар A═T и G≡C в ДНК.

Второе физическое свойство ДНК, обусловленное соотношением пар G≡C и A═T,–это плавучая плотность. Препарат ДНК с более высоким содержанием G≡C-пар обладает чуть большей плотностью, чем ДНК с повышенным содержанием A═T-пар. Препараты ДНК центрифугируют при высоких скоростях в концентрированном растворе хлористого цезия (CsCl), плотность которого лежит в том же диапазоне, что и плотность ДНК. При центрифугировании

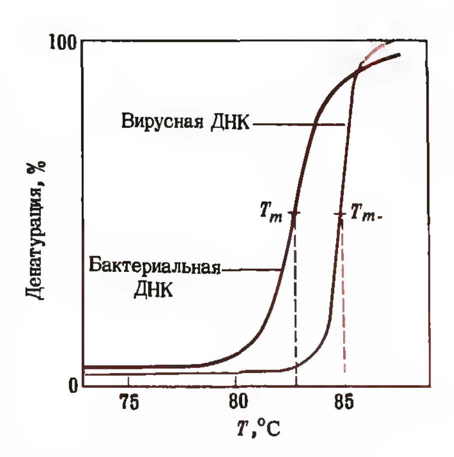


Рис. 27-16. Кривая денатурации (плавлеиия) двух препаратов ДНК. Температура, соответствующая средией точке перехода (T_m), называется точкой плавления. Поскольку величина T_m зависит от pH и концентрации соли, всегда иадо коикретизировать условия ее измереиия.



Рис. 27-15. Принцип гибридизационного теста. Два препарата ДНК, выделенной из организмов разных видов, нагревают так, что они полностью денатурируют и их цепи расходятся. При смешивании этих препаратов и медленном охлаждении комплементарные цепи ДНК каждого вида найдут друг друга и будут ренатурировать с образованием нормальных дуплексов. Если между двумя ДНК существует значительная гомология по последовательности, то возможно образование гибридных молекул, представляющих собой частичные дуплексы. Чем выше степень гомологии, тем больше вероятность образования гибридов. Содержание гибридов в смеси можно измерить разными способами, в частности с помощью хроматографии или центрифугирования в градиенте плотности. Обычно, чтобы упростить процедуру измерения, одну из ДНК метят радиоактивным изотопом.

в центрифужной пробирке формируется градиент плотности CsCl с наибольшей плотностью у дна пробирки. Если поместить в нее ДНК, то она сначала будет перемещаться по направлению ко дну пробирки, но затем в определенном положении остановится и будет держаться на плаву. В этом положении она не может ни всплыть, ни осесть, поскольку плотность раствора CsCl здесь равна ее плотности. С помощью этого метода, более подробно описанного в гл. 28, можно отделить друг от друга молекулы ДНК, различающиеся по содержанию G≡C-пар, поскольку они обладают разной плавучей плотностью. Исходя из плавучей плотности данной ДНК, можно подсчитать соотношение в ней пар G≡C и A═T.

27.11. Нативные молекулы ДНК очень хрупкие

В ранних экспериментах было показано, что молекулярная масса ДНК не превышает $10 \cdot 10^6$; это соответствует приблизительно 15000 пар оснований. Однако по мере усовершенствования методов выделения нативной ДНК оказалось, что ее молекулярная масса значительно больше. Сегодня мы знаем, что нативные

молекулы ДНК, например молекулы ДНК из клеток *E. coli*, настолько велики, что их непросто выделить в интактном виде, поскольку они легко разрушаются при механическом усилии. К разрывам в молекуле и в результате к образованию большого числа более коротких фрагментов может привести простое перемешивание или пропускание через пипетку раствора нативной ДНК. Однако при осторожном проведении процедур удается получать в интактной форме ДНК больших ДНК-содержащих вирусов и с помощью физических методов определять их молекулярные массы. Используя электронный микроскоп, можно непосредственно наблюдать отдельные молекулы ДНК и измерять их длину. Исследования с помощью электронного микроскопа показали, что тщательно приготовленные препараты ДНК – это не просто смесь полимеров разной длины; в их состав входят молекулы одинаковой длины и одинакового нуклеотидного состава. Рассмотрим теперь вопрос о размерах молекул ДНК, а также о других характеристиках ДНК, выделенных из вирусов, бактерий и эукариотических клеток.

27.12. Молекулы вирусной ДНК имеют относительно небольшие размеры

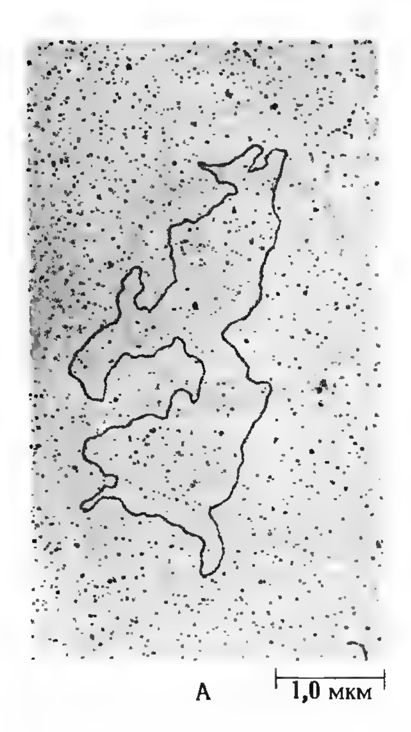
В табл. 27-4 представлены веса некоторых ДНК-содержащих вирусных частиц, их приблизительный размер, молекулярная масса их ДНК и число пар оснований, содержащихся в ее молекулах. Зная молекулярную массу двухцепочечной вирусной ДНК, можно определить ее *физическую длину*, так как молекулярная масса каждой нуклеотидной пары равна в среднем приблизительно 650, а на каждые 0,34 нм дуплекса, как мы уже видели, приходится одна нуклеотидная пара. Типичным примером мелкого ДНК-содержащего вируса может служить бактериофаг λ. Внутриклеточная, или репликативная, форма его ДНК представляет собой двойную спираль, в которой 5'- и 3'-концы каждой из цепей ковалентно соединены, образуя кольцо (не в смысле геометрической окружности, а в смысле линии, не имеющей концов). Двухцепочечная ДНК этого вируса имеет мол. массу $\sim 32 \cdot 10^6$, т. е. состоит приблизительно из 48 000 пар оснований; ее физическая длина равна $\sim 17{,}2$ мкм (рис. 27-17). ДНК многих других ДНК-содержащих вирусов также представляют собой кольцевые дуплексы. Некоторые вирусы, например *бактериофаг Т2*, содержат линейную двухцепочечную ДНК, т. е. молекулу с двумя концами, тогда как другие, например *бактериофаг фX174*, содержат молекулу ДНК, имеющую форму одноцепочечного кольца. В течение цикла репликации линейные ДНК часто переходят в кольцевую форму, а все одноцепочечные вирусные ДНК становятся двухцепочечными. Такие особые виды ДНК, которые появляются только в ходе репликации вируса, называются *репликативными формами*.

Другая важная особенность вирусных

Таблица 27-4. ДНК некоторых бактериальных вирусов

Вирус	Вес вирусной частицы, 10^6 дальтон	Длина частицы, нм	Молекулярная масса, 10^6	Приблизительное число пар оснований
фX174 (репликативная форма)	6	15	3,4	5 386[1]
T7	38	6	25	40 000
λ	50	20	32	48 000
T2, T4	220	18	120	182 000

[1] Поскольку для фага фX174 известна полная нуклеотидная последовательность ДНК; приведенная цифра соответствует точному числу пар оснований.



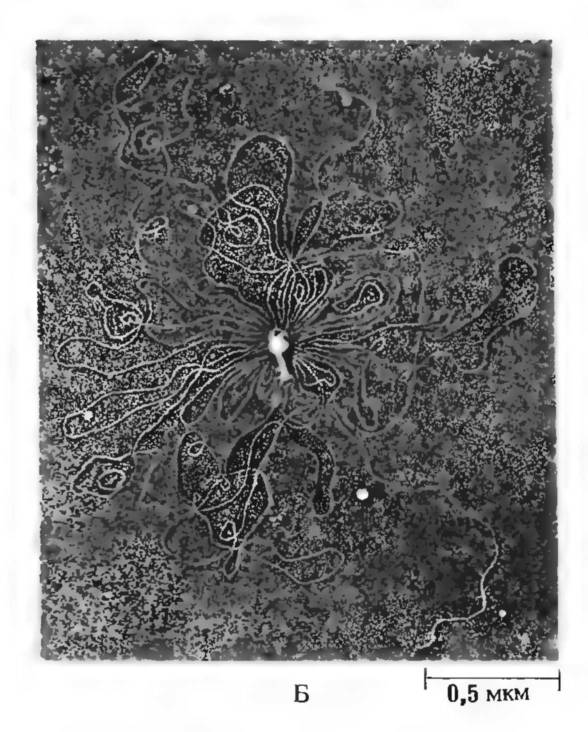


Рис. 27-17. Электронные микрофотографии ДНК двух бактериофагов. *А*. ДНК бактериофага λ. Молекулярная масса этой ДНК равна $\sim 32 \cdot 10^6$, а длина ее молекул $\sim 17{,}2$ мкм. *Б*. Электронная микрофотография бактериофага Т2, окруженного собственной линейной молекулой ДНК. ДНК освободилась из вирусной частицы и распространилась по поверхности в результате лизиса бактериофага в дистиллированной воде.

ДНК состоит в том, что их физическая длина намного превышает параметры вирусных частиц, в которых они находятся,–это хорошо видно на примере фага Т2 (рис. 27-17, табл. 27-4). Ясно, что ДНК вирусов должна быть очень компактно уложена, чтобы поместиться внутри вирусной частицы.

В РНК-содержащих вирусах хромосомой служит РНК. Вирусные РНК обычно сравнительно малы; они содержат небольшое число генов и состоят, как правило, из одной цепи. Подавляющее большинство растительных вирусов содержит РНК.

27.13. Хромосомы прокариотических клеток – это единичные очень длинные молекулы ДНК

В прокариотических клетках ДНК гораздо больше, чем в вирусах. К примеру, одна клетка *E. coli* содержит почти в 200 раз больше ДНК, чем частица бактериофага λ. Результаты генетических экспериментов, а также прямые микроскопические наблюдения показали, что ДНК *E. coli*–это одна очень длинная молекула. Она представляет собой ковалентно замкнутое двухцепочечное кольцо с мол. массой $\sim 26 \cdot 10^9$. Эта ДНК состоит приблизительно из четырех миллионов пар оснований, а ее физическая длина равна ~ 1400 мкм ($= 1{,}4$ мм), что в 700 раз превышает размеры самой клетки *E. coli* (2 мкм). В этом случае мы снова видим, что молекула ДНК плотно упакована, поскольку она целиком должна уместиться в ядерной зоне (разд. 2.5) клетки *E. coli*. Есть основания считать, что ДНК бактериальной клетки прикреплена в одной или нескольких точках к внутренней поверхности клеточной мембраны.

27.14. Кольцевые ДНК сверхспирализованы

Если тщательно и осторожно выделять кольцевые вирусные ДНК, то можно показать, что они являются *сверхспиральными*, или сверхскрученными. Создается впечатление, что двойная спираль прежде, чем концы ее цепей соединились в кольцо, была частично раскручена. Это обратное скручивание сообщает кольцевой молекуле ДНК вращающий момент, вследствие чего она закручивается сама на себя (рис. 27-18). Если такую сверхспиральную ДНК, в которой запасена дополнительная энергия, подвергнуть действию эндонуклеазы, разрывающей одну из цепей, то скрученность, вызванная обратным вращением, снимается и ДНК переходит в свое обычное низкоэнергетическое релаксированное состояние (рис. 27-18). Сверхспиральная вирусная ДНК более компактна, чем релаксированное кольцо.

Анализ ДНК, выделенной со всеми предосторожностями из *E. coli*, показал, что она образует множество петель, поддерживаемых вместе с помощью белков. Каждая из этих петель в свою очередь сверхспирализована (рис. 27-19). Образование петель и сверхспиральность помо-



Рис. 27-18. Кольцевая сверхспиральиая ДНК, закрученная в результате отрицательных поворотов, т.е. поворотов, противоположных по направлеиию к закручиванию самой двойиой спирали. Разрыв одиой из цепей такой ДНК снимает сверхспирализацию и приводит к переходу кольцевой ДНК в релаксированную форму.

Рис. 27-19. Электронная микрофотография интактной сверхспиральной хромосомы, выделенной из одной клетки *E. coli*. Интактность хромосомы была установлена с помощью сильно увеличенной фотографии. Чуть влево от центра видны фрагменты клеточной мембраны.



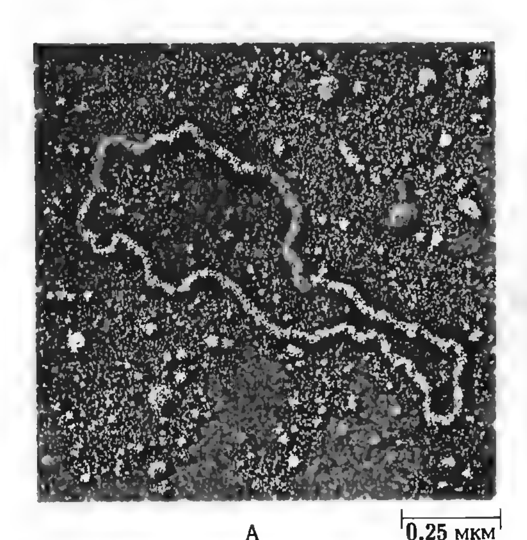
гают обеспечить упаковку очень больших кольцевых молекул ДНК в малых объемах, не ограниченных мембранами. Линейные ДНК не образуют сверхспираль до тех пор, пока оба конца молекулы не зафиксированы. Сверхспиральность играет важную роль во многих процессах, происходящих с участием ДНК. Некоторые белки и ферменты не связываются с ДНК, если она находится не в сверхспиральной форме. Ферменты, называемые топоизомеразами, могут регулировать степень сверхспиральности, увеличивая или уменьшая число сверхвитков.

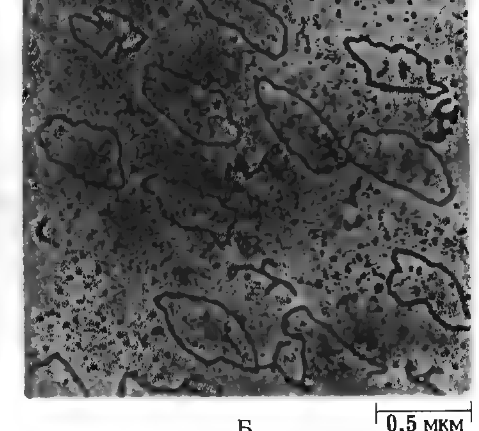
27.15. Некоторые бактерии содержат ДНК в виде плазмид

Кроме очень большой кольцевой хромосомы, расположенной в ядерной зоне, большинство бактерий содержат одну или несколько небольших кольцевых молекул ДНК, которые находятся в свободном состоянии в цитоплазме клетки. Эти экстрахромосомные элементы называют *плазмидами* (рис. 27-20). В большинстве своем плазмиды очень малы и содержат всего лишь несколько генов, т.е. гораздо меньше, чем бактериальная хромосома, в которой генов тысячи. В некоторых клетках, однако, плазмиды могут быть достаточно большими. Плазмиды несут генетическую информацию и реплицируются с образованием дочерних плазмид, которые при делении клетки переходят в дочерние клетки. В течение многих циклов деления клетки плазмиды «живут» своей собственной, обособленной от хромосомной ДНК «жизнью». Однако иногда они могут встраиваться в хромосомную ДНК и с таким же успехом покидать ее.

Некоторые плазмиды несут гены, которые определяют устойчивость бактерии-хозяина к антибиотикам, например тетрациклину и стрептомицину. Бактерии, содержащие такие плазмиды, устойчивы к этим антибиотикам. При лечении бактериальной инфекции антибиотиком эти клетки могут выжить в организме человека, так как антибиотик убивает только чувствительные к нему клетки. Устойчивые к антибиотику клетки могут затем размножаться и вызывать инфекцию, которую нельзя сдержать антибиотиком. По этой причине антибиотики не следует

Рис. 27-20. Электронные микрофотографии плазмид, выделенных из двух видов бактерий. *А*. Плазмида pSC101 из *E. coli*, которая придает клеткам устойчивость к тетрациклину. *Б*. Плазмиды из *Neisseria gonorrhoeae* – бактерии, вызывающей гонорею. Большинство молекул находится в релаксированном состоянии. На примере скрученных сверхспиральных плазмид (одна из них в центре фотографии) видно, насколько эффективной может оказаться компактная упаковка кольцевой ДНК в результате отрицательных поворотов.





применять для лечения инфекций без разбора: всегда необходимо быть уверенным в том, что возбудитель данной болезни чувствителен к используемому антибиотику. Плазмиды могут переноситься из устойчивых к антибиотику клеток в чувствительные клетки того же или другого вида, делая эти клетки устойчивыми.

Другая важная особенность плазмид состоит в том, что их можно очень легко выделить из бактериальных клеток. В выделенную плазмиду можно встроить новые гены из других видов и затем такую модифицированную плазмиду ввести обратно в обычную для нее клетку-хозяина. Такая плазмида, несущая чужеродный ген, будет реплицироваться и транскрибироваться и может заставить клетку-хозяина синтезировать белки, кодируемые искусственно встроенным геном, даже если он не является частью нормального генома клетки. Позже мы увидим, как получают такие *рекомбинантные ДНК*, как они транскрибируются и транслируются с образованием потенциально полезных продуктов.

27.16. Эукариотические клетки содержат гораздо больше ДНК, чем прокариоты

Теперь мы совершим большой скачок и перейдем от прокариотических клеток к гораздо более сложным – эукариотическим. Эукариоты содержат значительно больше ДНК, чем прокариоты. Отдельная клетка миксомицета, одного из самых примитивных эукариот, более чем в 10 раз превосходит по содержанию ДНК клетку *E. coli*. В клетках плодовой мушки *Drosophila*, используемой в классических генетических исследованиях, количество ДНК более чем в 25 раз превышает ее количество в клетках *E. coli*. А клетки человека и многих других млекопитающих содержат приблизительно в 600 раз больше ДНК, чем *E. coli*.

Общая физическая длина всей ДНК в одной-единственной клетке человека составляет ~2 м (для сравнения длина ДНК *E. coli* равна 1,4 мм). Поскольку в организме взрослого человека находится ~10^{13} клеток, общая длина всей ДНК человека составляет ~$2 \cdot 10^{13}$ м, или $2 \cdot 10^{10}$ км. Сравните эту величину с окружностью земного шара ($4 \cdot 10^4$ км) или расстоянием от Земли до Солнца ($1{,}44 \cdot 10^8$ км)!

При наблюдении в микроскоп за ядром делящихся эукариотических клеток было обнаружено, что их генетический материал распределен по хромосомам, число которых зависит от вида организма (табл. 27-5). В клетке человека, например, содержится 46 хромосом. В настоящее время установлено, что каждая хромосома эукариотической клетки типа показанной на рис. 27-21 содержит одну очень большую молекулу двухцепочечной ДНК, длина которой может в 4–100 раз превышать длину ДНК *E. coli*. Например, физическая длина молекулы ДНК одной из наиболее мелких хромосом человека составляет ~30 мм, что почти в 15 раз больше длины молекулы ДНК *E. coli*. Молекулы ДНК в сорока шести хромосомах человека не одинаковы по размеру: они могут различаться между собой более чем в 25 раз. Эукариотические ДНК имеют не кольцевую структуру, а линейную. Каждая эука-

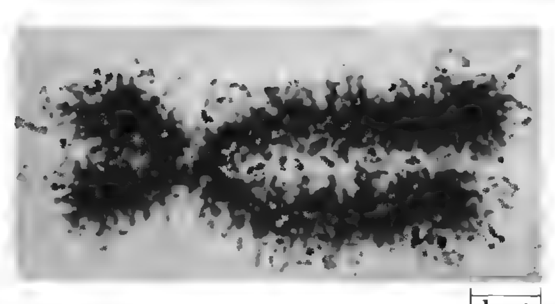


Рис. 27-21. Электронная микрофотография хромосомы 12 человека.

Таблица 27-5. Нормальное число хромосом у разных видов

Прокариоты			
Бактерии	1		
Эукариоты			
Дрозофила	8	Лиса	34
Красный клевер	14	Кошка	38
Огородный горох	14	Мышь	40
Медоносная пчела	16	Крыса	42
Кукуруза	20	Кролик	44
Лягушка	26	Человек	46
Гидра	30	Курица	78

риотическая хромосома несет уникальный набор генов. Совокупность всех генов клетки составляет ее геном.

Размер типичной клетки человека, например клетки печени, составляет в поперечнике ~25 мкм. Ее ядро, размером ~5 мкм в диаметре, содержит 46 хромосом, суммарная длина ДНК которых равна 2 м. Как мы увидим дальше, упаковка ДНК в эукариотических хромосомах существенно отличается от ее упаковки в прокариотических хромосомах.

27.17. Эукариотические хромосомы состоят из хроматиновых волокон

Мы уже использовали термин «хромосома» по отношению к молекуле нуклеиновой кислоты, которая представляет собой хранилище генетической информации вируса, прокариота или эукариотической клетки. Однако первоначально слово «хромосома» (т. е. «окрашенное тело») использовалось в другом смысле, для обозначения густо окрашенных образований в эукариотических ядрах, которые можно было наблюдать в световой микроскоп после обработки клеток красителем. Эукариотические хромосомы, в изначальном смысле этого слова, выглядят как резко очерченные структуры только непосредственно до и во время митоза — процесса деления ядра в соматических клетках (рис. 27-22). В покоящихся, неделящихся эукариотических клетках хромосомный материал, называемый *хроматином*, выглядит нечетко и как бы беспорядочно распределен по всему ядру. Однако, когда клетка готовится к делению, хроматин уплотняется и собирается в свойственное данному виду число хорошо различимых хромосом (рис. 27-22).

Хроматин был выделен из ядер и проанализирован. Он состоит из очень тонких волокон, которые содержат ~60% белка, ~35% ДНК и, вероятно, ~5% РНК (разд. 2.7). Хроматиновые волокна в хромосоме свернуты и образуют множество узелков и петель (рис. 27-21). ДНК в хроматине очень прочно связана с белками, называемыми *гистонами*, функция которых состоит в упаковке и упорядочении ДНК в структурные единицы – *нуклеосомы*. В хроматине содержится также ряд негистоновых белков. В отличие от эукариотических бактериальные хромосомы не содержат гистонов; в их состав входит лишь небольшое количество белков, способствующих образованию петель и конденсации (уплотнению) ДНК.

27.18. Гистоны – это небольшие основные белки

Гистоны найдены в хроматине всех соматических эукариотических клеток, но ни разу не были обнаружены у прокариот. Их мол. масса лежит в пределах от 11 000 до 21 000. Гистоны очень богаты основными аминокислотами – аргинином и лизином, на долю которых приходится до 25% аминокислотных остатков белка. Поскольку боковые (R) группы остатков аргинина и лизина при pH 7 протонированы и потому несут положительный заряд, гистоны соединяются с отрицательно заряженной двухцепочечной ДНК с образованием ДНК-гистонового комплекса, который стабилизирован силами электростатического притяжения.

Пять основных классов гистонов, найденных во всех эукариотических клетках, различаются по молекулярной массе и аминокислотному составу (табл. 27-6). Гистон H1 – лизин-богатый белок (29% лизина), гистоны H2A и H2B содержат

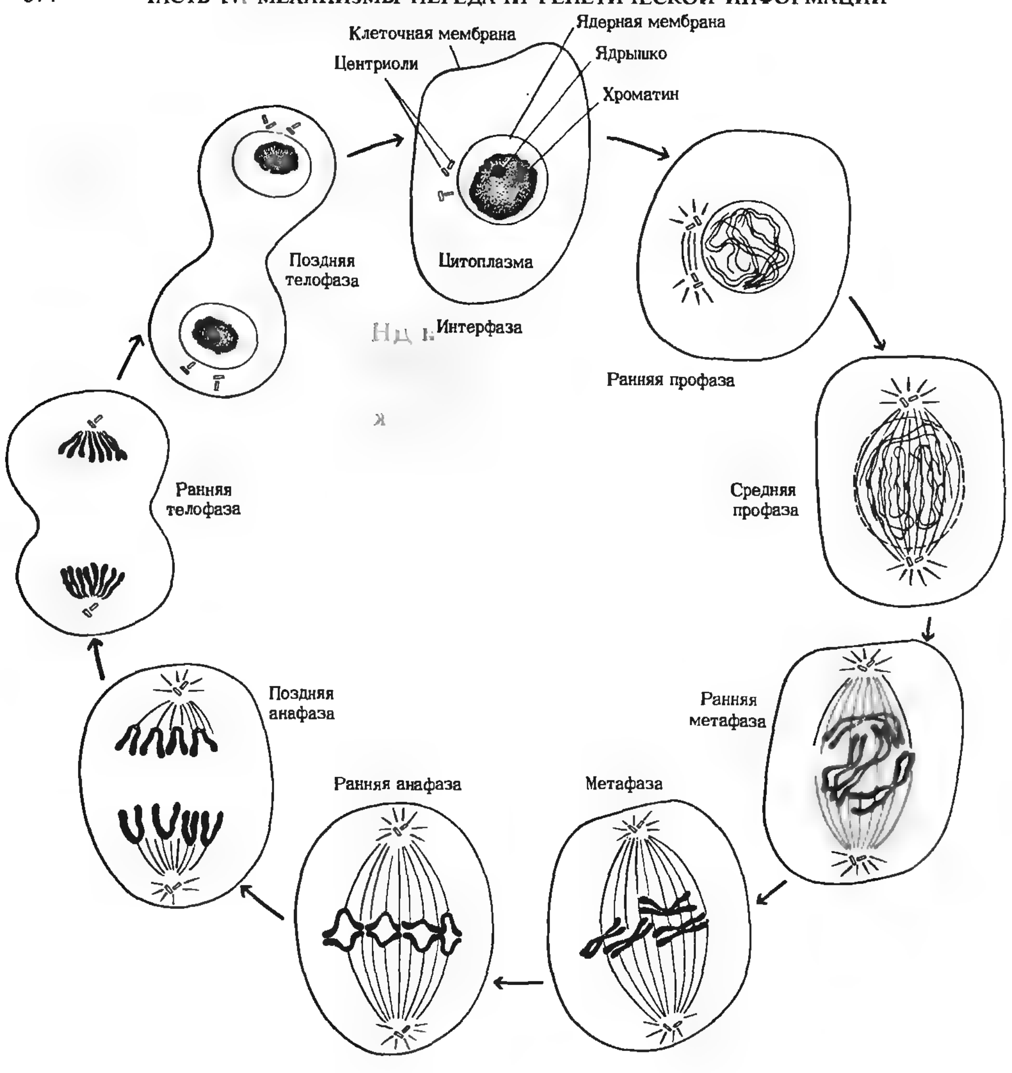


Рис. 27-22. Стадии митоза. Обратите внимание, что в интерфазе (т.е. между делениями) хроматин дисперсно распределен по ядру. В ходе подготовки клетки к делению хроматин собирается в хорошо различимые хромосомы. Затем в анафазе парные дочерние хромосомы разделяются. На стадии поздней телофазы, непосредственно перед делением дочерних клеток, хроматин в них снова становится дисперсным.

Таблица 27-6. Гистоны

Гистон	Мол. масса	Лизин, %	Аргинин, %
H1	21 000	29	1,5
H2A	14 500	11	9,5
H2B	13 700	16	6,5
H3	15 300	10	13,5
H4	11 300	11	14

много и лизина, и аргинина, причем первого больше; гистоны Н3 и Н4 содержат несколько больше аргинина, чем лизина, и относятся к аргинин-богатым белкам. Аминокислотные последовательности гистонов Н3 и Н4 у всех эукариот почти одинаковы, откуда следует, что оба эти гистона выполняют во всех эукариотических клетках одну и ту же функцию. Сходство аминокислотных последовательностей в случае гистонов Н1, Н1А

и H2B из разных эукариотических видов выражено не так сильно.

Каждый из гистонов может существовать в различных формах, так как R-группы некоторых из входящих в их состав аминокислот могут быть ферментативным путем модифицированы – метилированы, фосфорилированы или ацетилированы. Такие модификации R-групп гистонов могут изменять их суммарный электрический заряд и другие свойства. Например, ацетилирование ε-аминогрупп остатков лизина приводит к нейтрализации их положительных зарядов.

27.19. ДНК-гистоновые комплексы образуют похожие на бусинки нуклеосомы

Хроматиновые волокна напоминают по внешнему виду нитки бус (рис. 27-23). Повторяющиеся, похожие на бусинки структуры этих волокон носят название *нуклеосом*. Нуклеосома представляет собой комплекс, состоящий из двухцепочечной ДНК длиной около двухсот пар оснований и набора молекул гистонов, вокруг которого дважды обвита эта ДНК; нуклеосомы («бусинки») имеют диаметр 10–11 нм. В состав каждой нуклеосомы входит восемь молекул гистонов – по две молекулы гистонов H2A,

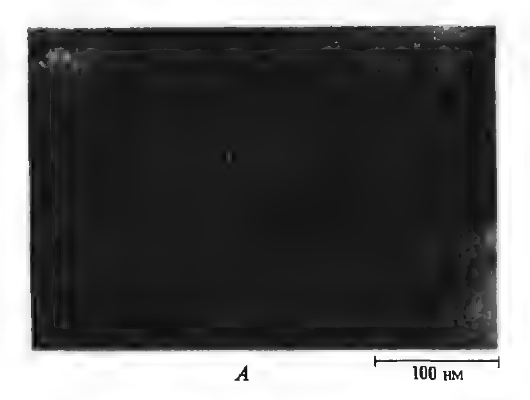
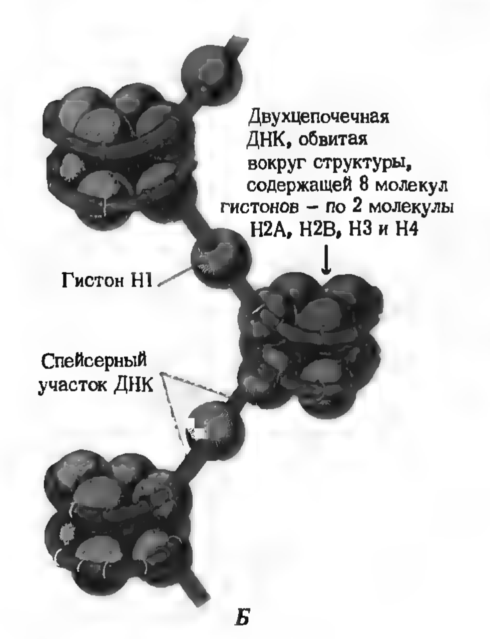
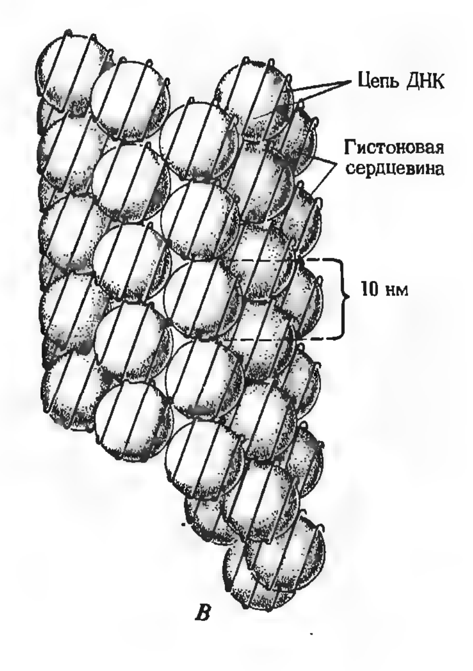


Рис. 27-23. Нуклеосомы. *А*. Электронная микрофотография вытянутых хроматиновых волокон: видны похожие на бусинки нуклеосомы. *Б*. Схематическое изображение вытянутого участка хроматинового волокна, иллюстрирующее структуру нуклеосом. *В*. Схематическое изображение компактной структуры, образованной нуклеосомами и спейсерными участками ДНК.





Н2В, Н3 и Н4. Нить ДНК намотана на гистоновое ядро нуклеосомы снаружи.

В промежутках между нуклеосомами расположена соединительная (линкерная, спейсерная) ДНК, с которой связывается гистон H1. Длина соединительных участков ДНК варьирует в пределах от 20 до 120 нуклеотидных пар в зависимости от вида организма и типа клеток. В хроматиновых волокнах человека длина этих участков около 50 нуклеотидных пар. Нуклеосомы – это структурные единицы хроматина, выполняющие главным образом функцию плотной упаковки ДНК. В дополнение к укорачиванию двухцепочечной ДНК за счет того, что она обвивает гистоны, добавочное укорачивание и плотная упаковка эукариотической ДНК в хроматине достигается в результате упорядоченного расположения нуклеосом в пространстве (рис. 27-23). Хроматин связан также с негистоновыми белками ядра, которые образуют ядерный матрикс.

27.20. Эукариотические клетки содержат также цитоплазматическую ДНК

Кроме ДНК, обнаруживаемой в ядре эукариотических клеток, в цитоплазме также присутствует очень небольшое количество ДНК, отличающейся от ядерной по нуклеотидному составу; эта цитоплазматическая ДНК локализована в митохондриях. Хлоропласты фотосинтезирующих клеток также содержат ДНК. Обычно в покоящихся соматических клетках ДНК этих органелл составляет менее 0,1% всей клеточной ДНК, однако в оплодотворенных и делящихся яйцеклетках, где число митохондрий сильно увеличено, количество митохондриальной ДНК значительно выше. Митохондриальные ДНК (мДНК)–это двухцепочечные кольцевые молекулы очень малого по сравнению с молекулами ДНК ядерной хромосомы размера. В животных клетках мДНК имеет мол. массу всего $\sim 10 \cdot 10^6$. Молекулы хлоропластной ДНК значительно больше ДНК митохондрий. ДНК обеих этих органелл не связана с гистонами.



Рис. 27-24. Делящаяся митохондрия из жирового тела насекомого.

О происхождении митохондриальной и хлоропластной ДНК было высказано множество предположений. Одно из них состоит в том, что они представляют собой остатки хромосом древних бактерий, которые попали в цитоплазму клетки-хозяина и стали предшественниками этих органелл. Митохондриальная ДНК кодирует митохондриальные тРНК и рРНК, а также несколько митохондриальных белков. Поскольку свыше 95% митохондриальных белков кодируется ядерной ДНК, причина существования митохондриальной и хлоропластной ДНК является одной из загадок генетики клетки. В процессе деления клетки-хозяина митохондрии и хлоропласты также делятся (рис. 27-24). До и во время деления митохондрий их ДНК реплицируются и дочерние мДНК переходят в дочерние митохондрии.

27.21. Гены – это участки ДНК, которые кодируют полипептидные цепи и РНК

Рассмотрим теперь наиболее важные в функциональном отношении части молекул ДНК – гены. В классическом биологическом смысле ген определяли как часть хромосомы, которая обусловли-

вает какой-нибудь один отличительный признак организма, или *фенотип*, например цвет глаз. (Слово «фенотип» означает «внешний вид».) В дальнейшем появилось и молекулярное определение гена, впервые предложенное Джорджем Бидлом и Эдвардом Татумом в 1940 г. Они воздействовали на споры гриба *Neurospora crassa* рентгеновскими лучами и другими агентами, которые повреждают ДНК и таким образом вызывают мутации. Некоторые из полученных ими мутантов оказались лишенными того или иного фермента, в результате чего их метаболизм был нарушен (разд. 13.14). Это наблюдение привело авторов к заключению, что ген–это такой фрагмент генетического материала, который определяет, или кодирует, какой-то один фермент (гипотеза «*один ген–один фермент*»). Позже это определение гена приобрело более общий вид: «*один ген–один белок*», поскольку некоторые гены кодируют белки, не являющиеся ферментами. Однако теперь можно дать еще более точное биохимическое определение гена.

Вспомним, что многие белки состоят из нескольких полипептидных цепей (разд. 8.8). В некоторых из таких белков все полипептидные цепи одинаковы; в этом случае все они могут кодироваться одним и тем же геном. Однако другие белки содержат два или большее число полипептидных цепей разных типов, различающихся по аминокислотной последовательности. Молекула гемоглобина, к примеру, состоит из полипептидных цепей двух типов–α и β, которые различаются длиной и аминокислотной последовательностью. Сегодня мы знаем, что α- и β-цепи кодируются двумя разными генами. Поэтому взаимосвязь между геном и белком более точно может быть выражена определением: «*один ген–один полипептид*».

Но не все гены экспрессируются в конечном счете с образованием полипептидных цепей. Часть генов кодирует, например, разные виды тРНК, другие гены отвечают за синтез различных рРНК. Гены, кодирующие полипептиды и РНК. называют *структурными генами*, ибо они определяют структуру некоего конечного продукта гена–фермента или стабильной РНК. В ДНК содержатся и другие участки или последовательности, которые выполняют исключительно регуляторную функцию. Некоторые из этих регуляторных участков представляют собой сигналы, обозначающие начало и конец структурных генов; другие принимают участие в запуске или прекращении транскрипции структурных генов. Таким образом, наряду со структурными генами хромосома содержит также *регуляторные последовательности*.

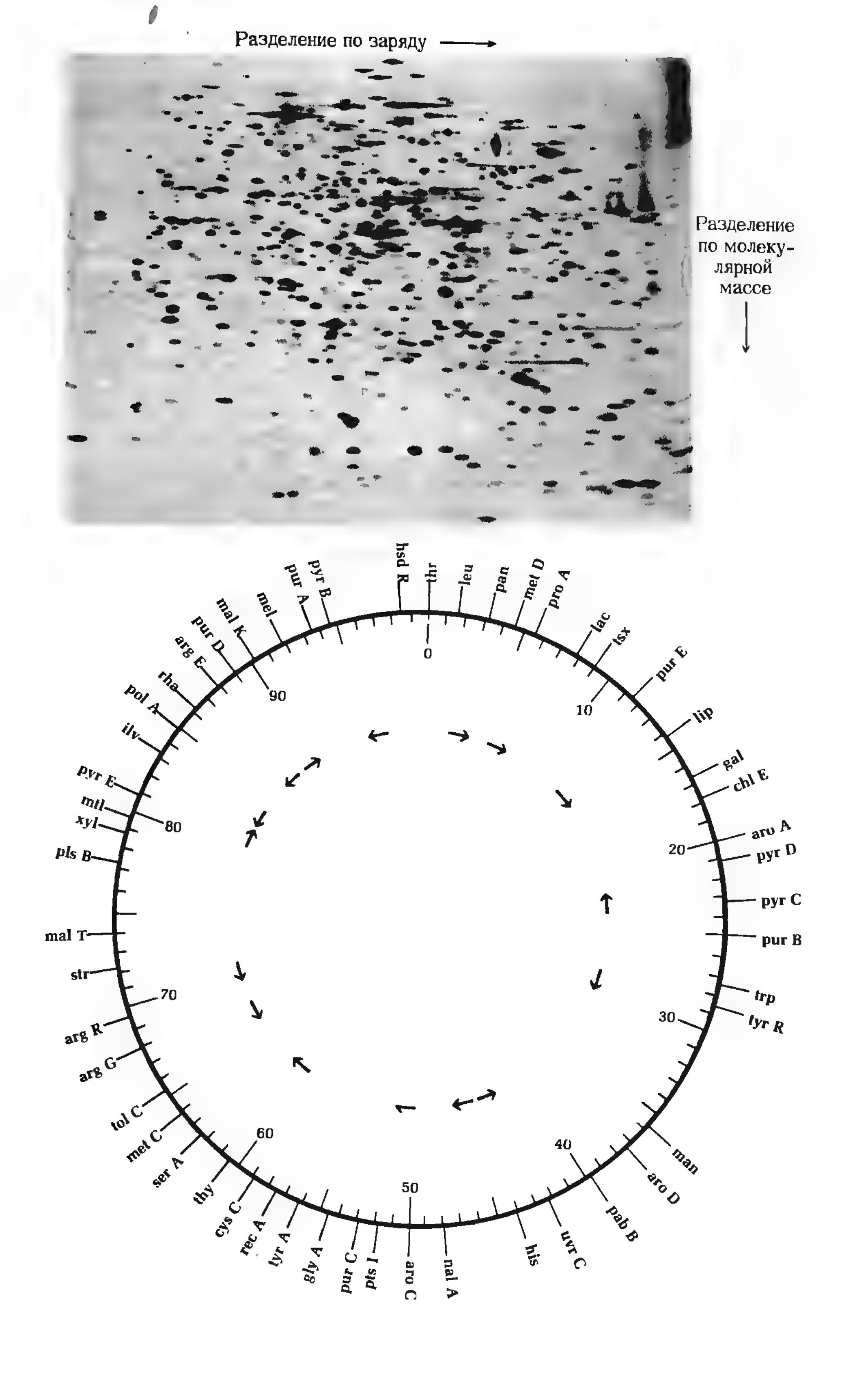
27.22. В одной хромосоме сосредоточено большое число генов

Сколько генов содержится в одной хромосоме? На этот вопрос мы можем дать приблизительный ответ в случае *E. coli*. Предполагают, что в единственной хромосоме *E. coli* содержится более 3000 генов, возможно даже 5000. Была сделана попытка непосредственно подсчитать все полипептиды, присутствующие в *E. coli* после разделения их методом двумерного электрофореза. На электрофореграммах было обнаружено около 1100 пятен, соответствующих отдельным полипептидным цепям (рис. 27-25). Однако это число является минимальным, поскольку данный метод не позволяет разделить все полипептиды и не обладает достаточной чувствительностью, чтобы уловить присутствие белков, представленных в клетке всего лишь несколькими молекулами.

С помощью различных генетических подходов была установлена последовательность расположения многих генов в хромосомах вирусов и бактерий. Частичная генетическая карта *E. coli*, приведенная на рис. 27-26, показывает относительное расположение некоторых ее генов в кольцевой молекуле ДНК.

27.23. Каковы размеры генов?

Можно теоретически рассчитать примерные размеры генов. Мы уже видели, что двухцепочечная молекула ДНК *E.*



Разделение по заряду
Разделение по молекулярной массе
hsd R
thr
leu
pan
met D
pro A
lac
tsx
pur E
lip
gal
chl E
aro A
pyr D
pyr C
pur B
trp
tyr R
man
aro D
pab B
uvr C
his
nal A
aro C
pts I
pur C
gly A
tyr A
rec A
cys C
thy
ser A
met C
tol C
arg G
arg R
str
mal T
pls B
xyl
mtl
pyr E
ilv
pol A
rha
arg E
pur D
mal K
mel
pur A
pyr B
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90

Рис. 27-25. Фракционирование белков *E. coli*. На фотографии представлена хроматограмма двумерного разделения полипептидных цепей, присутствующих в экстракте *E. coli*. На хроматограмме можно обнаружить свыше 1100 различных полипептидов. Вероятно, в экстракте их значительно больше, однако они не все выявляются. В настоящее время делаются попытки разделить и посчитать все полипептиды, присутствующие в различных клетках человека.

coli состоит приблизительно из $4 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар. Если считать, что в этой бактерии содержится 300 генов, то средний размер каждого из них составит $(4 \cdot 10^6):3000 \approx 1300$ нуклеотидных пар. Это, вероятно, завышенная оценка, поскольку в ней не учтено наличие в ДНК сигналов, промежутков между генами (спейсеров) и других участков ДНК с еще неизвестной функцией.

Размеры генов можно приблизительно оценить и более прямым способом. Сегодня уже известно, что каждая аминокислота полипептидной цепи кодируется короткой последовательностью, состоящей из трех расположенных друг за другом нуклеотидов в одной из цепей прокариотической ДНК (рис. 27-27). Поскольку в генетическом коде нет «запятых», кодирующие триплеты ДНК расположены последовательно в соответствии с последовательностью аминокислот в кодируемом полипептиде. На рис. 27-27 показан принцип, определяющий структурное соотношение на основе кода между ДНК, РНК и белком. В связи с тем что одна полипептидная цепь может содержать от 50 до 2000 (и даже больше) аминокислотных остатков (разд. 6.5), ген, кодирующий такую полипептидную цепь, должен состоять со-

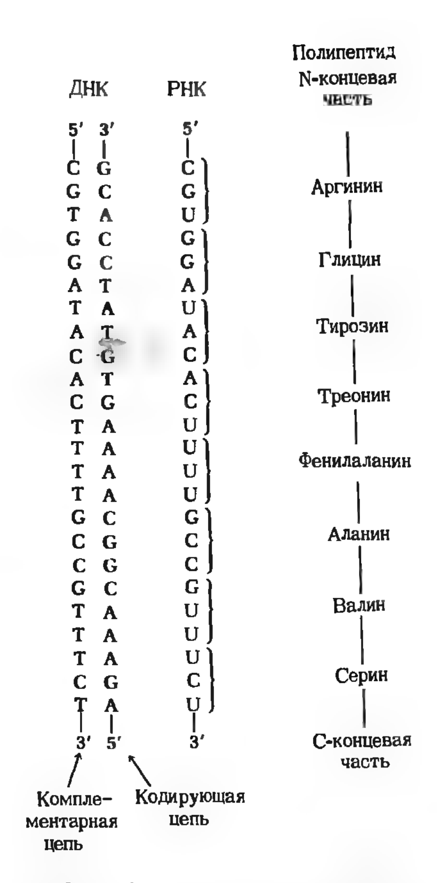


Рис. 27-27. Коллинеарность нуклеотидных последовательностей ДНК и мРНК и аминокислотной последовательности полипептидных цепей. Триплеты нуклеотидов ДНК определяют последовательность аминокислот в белке; посредником в этом процессе выступает мРНК, нуклеотидные триплеты которой (кодоны) комплементарны триплетам кодирующей цепи ДНК.

ответственно из 150–6000 (и больше) нуклеотидных остатков. Если принять, что полипептидная цепь белка содержит в среднем 350 остатков, то ей соответствует средний ген, включающий 1050 нуклеотидных пар, т.е. содержащихся в ДНК *E. coli* четырех миллионов нуклеотидных пар достаточно для кодирования $(4 \cdot 10^6):1050 \approx 3800$ генов.

Тот факт, что пары оснований в двойной спирали ДНК расположены на расстоянии 0,34 нм друг от друга (разд. 27.6), позволяет нам рассчитать длину гена среднего полипептида: $0{,}34 \cdot 1050 = 357$ нм $\simeq 0{,}36$ мкм. Поскольку

Рис. 27-26. Кольцевая карта хромосомы *E. coli* K12. На внешней стороне окружности указаны условные названия 52 генов, относительное положение которых на хромосоме точно известно; они служат ориентирами при картировании других генов. Числа внутри окружности соответствуют времени (в минутах), необходимому для переноса мужской хромосомы в женскую клетку в ходе половой конъюгации *E. coli*. За нулевую точку выбран ген *thr*. Стрелками указано направление проникновения в клетку мужской хромосомы. Из 3000 генов *E. coli* к настоящему времени картировано около 1000.

ку мол. масса одной нуклеотидной пары составляет в среднем 650, мол. масса среднего гена *E. coli* равна $\sim 650 \cdot 1050 = 680\,000$.

Гены, кодирующие тРНК, значительно меньше, чем гены, кодирующие полипептиды, поскольку один нуклеотид тРНК кодируется одним нуклеотидом ДНК.

27.24. Бактериальная ДНК защищена с помощью систем рестрикции–модификации

Уже давно было известно, что в бактериальной ДНК среди миллионов обычных оснований (А, Т, G и С) встречаются основания, несущие дополнительные метильные группы. Биологическое значение этих метилированных оснований стало понятным в результате ряда важных открытий, которые оказали большое влияние на развитие генетики и, в частности, биохимической генетики. Для каждого вида бактерий характерна своя особая картина распределения метилированных оснований по ДНК, отличающая ее от ДНК других видов. Если ДНК какого-либо другого вида каким-то образом проникнет в живую бактериальную клетку, то она будет признана там «чужеродной» именно по отсутствию в ней специфической для данного вида картины распределения метилированных оснований, присущей ДНК клеток этого вида. В такой ситуации чужеродная ДНК будет разрушена специфической нуклеазой, которая расщепляет обе цепи ДНК непосредственно в том месте, где отсутствуют характерные для ДНК клетки-хозяина метилированные основания, или вблизи этого места. Таким образом чужеродные ДНК подвергаются *рестрикции*: они разрушаются с помощью специфических нуклеаз, вырабатываемых каждым видом бактерий.

ДНК бактерий данного вида защищена двумя близкими по своей специфичности ферментами: 1) *модифицирующей метилазой* и 2) *рестриктирующей эндонуклеазой*. Модифицирующая метилаза отвечает за образование специфической для данного вида картины метилирования в определенных коротких последовательностях собственной ДНК клетки. Метильные группы в этих последовательностях остаются без изменений в течение всей жизни клетки. Соответствующая рестриктирующая эндонуклеаза в свою очередь расщепляет обе цепи любой другой ДНК, в которой эти специфические последовательности оснований не метилированы. Примером может служить рестриктирующая эндонуклеаза *Hind*II бактерии *Haemophilus influenzae* (каждая рестриктирующая эндонуклеаза имеет свое обозначение). Этот фермент расщепляет обе цепи любой ДНК, содержащей определенную последовательность оснований в местах, указанных стрелками:

```
            Сайт рестрикции
                  ↓
5′  –G–T–Py–Pu–A–C–  3′
              ●
3′  –C–A–Pu–Py–T–G–  5′
                  ↑
```

но не расщепляет эту же последовательность, если основания, отмеченные красной звездочкой, метилированы:

```
                     *
5′  –G–T–Py–Pu–A–C–  3′
              ●
3′  –C–A–Pu–Py–T–G–  5′
       *
```

Интересно, что этот короткий участок ДНК, метилированный или неметилированный, обладает внутренней симметрией относительно центральной точки, показанной красным цветом. Если повернуть этот участок на 180° в плоскости рисунка вокруг центральной точки, то он будет читаться точно так же, как до поворота. Такой тип симметрии характеризуется *осью симметрии второго порядка*. Большинство проверенных последовательностей модификации-рестрикции обладают симметрией второго порядка. Рестриктирующая эндонуклеаза *Hind* II расщепляет обе цепи в середине этого участка в любой ДНК, в которой эта последовательность не метилирована. Будучи расщепленной таким образом, чужеродная ДНК не может быть исправлена и поэтому не может реплицироваться.

В дальнейшем под действием других клеточных нуклеаз такая ДНК разрушается до мононуклеотидов.

В табл. 27-7 приведены специфические последовательности, атакуемые типичными рестриктирующими эндонуклеазами (обозначенными символами) из разных видов бактерий. Каждая из узнаваемых таким ферментом последовательностей обладает симметрией второ-

Таблица 27-7. Специфичность некоторых рестриктирующих эндонуклеаз[1)]

Образует тупые концы

Hin dII
5′ –G–T–Py–↓Pu–A*–C– 3′
●
3′ –C–A*–Pu–Py–T–G– 5′ (↑ между Pu и Py)

Hpa I
5′ –G–T–T–↓A–A–C– 3′
●
3′ –C–A–A–T–T–G– 5′ (↑ между A и T)

Образует выступающие концы

Eco RI
5′ –G–↓A–A*–T–T–C– 3′
●
3′ –C–T–T–A*–A–G– 5′ (↑ между A и G)

Eco RII
5′ –↓N–C–C*–N–G–G–N– 3′
●
3′ –N–G–G–N–C*–C–N– 5′ (↑ между C и N)

Hin dIII
5′ –A*–↓A–G–C–T–T– 3′
●
3′ –T–T–C–G–A–A*– 5′ (↑ между A и A)

1) Жирной красной точкой обозначена ось симметрии второго порядка, красными стрелками показаны места расщепления. Красными звездочками указаны места метилирования (если они известны) в организме, из которого данный фермент выделен: *Haemophilus influenza* для *Hin* dII и *Hin* dIII, *E. coli* для *Eco* RI и *Eco* RII и *Haemophilus parainfluenza* для *Hpa* II. Pu – пурин, Py – пиримидин, N – A или T.

го порядка. В зависимости от типа рестриктирующей эндонуклеазы в месте расщепления двухцепочечной ДНК образуются либо «тупые», т. е. заполненные концы (как в случае описанной выше *Hind* II), либо выступающие концы (примером может служить эндонуклеаза *Eco* RI из *E. coli*). В последнем случае два перекрывающихся конца называют *липкими*, поскольку они способны образовать друг с другом комплементарные пары оснований.

Было подсчитано, что последовательности из шести нуклеотидов с осевой симметрией второго порядка могут встречаться в любой ДНК независимо от вида с вероятностью 1 : 4000. Поскольку молекулы ДНК бактерий состоят из миллионов нуклеотидных пар, вероятность того, что любая бактериальная ДНК расщепится хотя бы один раз любой данной рестриктирующей эндонуклеазой, очень велика. Однако клетка-хозяин защищает свою собственную ДНК путем метилирования одного или нескольких оснований в последовательности, подверженной рестрикции; метилированная последовательность не связывается с рестриктирующей эндонуклеазой и потому не расщепляется.

У разных видов бактерий обнаружено уже свыше 150 различных рестриктирующих эндонуклеаз. Некоторые бактерии содержат больше одного набора модифицирующих метилаз и рестриктирующих эндонуклеаз. Однако ДНК вирусов бактерий научились с помощью ряда способов преодолевать рестрикционную защиту клеток их хозяев. Некоторые вирусные ДНК содержат разного рода модифицированные основания, которые позволяют им избегать расщепления рестриктирующими эндонуклеазами клетки-хозяина, в которую они попали. Модифицирующими группами в таких вирусных ДНК служат метильные, гидроксиметильные и глюкозильные группы. Другие вирусы в ходе эволюции приобрели такие последовательности в ДНК, которые не содержат участков, узнаваемых некоторыми рестриктирующими эндонуклеазами.

Рестриктирующие нуклеазы оказались

исключительно полезными в качестве инструмента в генетических исследованиях, поскольку они позволяют воспроизводимо осуществлять расщепление обеих цепей ДНК в строго определенных точках. Обнаружение ферментов с такими свойствами открыло новую эру в биохимии генов. Благодаря рестриктирующим эндонуклеазам, многие из которых в настоящее время производятся фирмами и поступают в продажу, стало возможным целенаправленное разрезание и картирование хромосом; эти ферменты стали также необходимым инструментом при определении нуклеотидных последовательностей ДНК. Рестриктирующие эндонуклеазы позволили начать работы по встраиванию генов одного организма в геном другого (гл. 30). Ученым, открывшим явление рестрикции ДНК, изучившим природу действия рестриктирующих эндонуклеаз и показавшим возможность их использования для вырезания генов,– Вернеру Арберу из Швейцарии, Гамильтону Смиту и Даниэлю Натансу (оба последних из США) в 1978 г. была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

27.25. Эукариотические ДНК содержат многократно повторяющиеся последовательности оснований

Прокариоты обычно содержат только одну копию ДНК на клетку, и почти во всех случаях в каждой молекуле ДНК присутствует лишь одна копия любого гена. Кроме регуляторных и сигнальных последовательностей в прокариотической ДНК встречается довольно мало молчащих, т.е. нетранслируемых, участков. Более того, между каждым геном и аминокислотной последовательностью (или последовательностью РНК), которую этот ген кодирует, существует строгая коллинеарность (рис. 27-27).

Организация генов в эукариотической ДНК и в структурном, и в функциональном отношении гораздо сложнее. В ДНК мыши, например, были обнаружены фрагменты, присутствующие в ней во множестве копий. Когда попытались определить, насколько распространены такие фрагменты, получили удивительные результаты. Оказалось, что ~ 10% мышиной ДНК состоит из повторяющихся миллионы раз коротких (менее 10 пар оснований) последовательностей. Это так называемые *высокоповторяющиеся последовательности.* Еще 20% мышиной ДНК представляют собой участки, повторяющиеся не менее 1000 раз и обозначаемые как *умеренные повторы.* Оставшиеся ~ 70% ДНК состоят из уникальных, т.е. неповторяющихся последовательностей, а также из последовательностей, повторяющихся всего лишь несколько раз. Наиболее высокоповторяющиеся последовательности называют *сателлитной ДНК*; считается, что они представляют собой нетранслируемые участки.

Подобные эксперименты были проведены и на многих других эукариотических организмах. В настоящее время создается впечатление. что все эукариотические хромосомы содержат повторяющиеся последовательности ДНК (повторы), в то время как у прокариот они, как правило, отсутствуют. Число высоко- и умеренноповторяющихся последовательностей варьирует у разных видов эукариот.

27.26. Некоторые эукариотические гены присутствуют во множестве копий

Некоторые гены присутствуют в клетке в большом количестве копий, по крайней мере на определенных этапах жизненного цикла. Наиболее ярким примером может служить набор генов, кодирующих четыре рРНК, встречающийся в нормальной соматической клетке во множестве копий. Яйцеклетки амфибий способны еще дополнительно увеличивать число генов для трех из четырех рРНК. Это вызвано настоятельной необходимостью, поскольку после оплодотворения эти клетки претерпевают очень быстрый рост и деление, в ходе которого им требуется много рибосом для синтеза всех клеточных белков. В большом количестве присутствуют также гены, коди-

рующие гистоны,–вплоть до 1000 копий в ряде эукариотических видов. Эмбрионы на ранних стадиях развития должны очень быстро синтезировать гистоны в процессе своего ускоренного роста. Гены, кодирующие кератины – белки, составляющие основу перьев, также содержатся в геноме цыплят в большом числе копий.

Можно было бы ожидать, что гены, кодирующие другие белки, встречающиеся в очень больших количествах в ряде клеток и тканей эукариот (например, гемоглобин, сывороточный альбумин, коллаген или яичный альбумин), также будут присутствовать во множестве копий. Оказалось, однако, что это не всегда так. Большинство эукариотических генов находится в виде одной или очень небольшого числа копий.

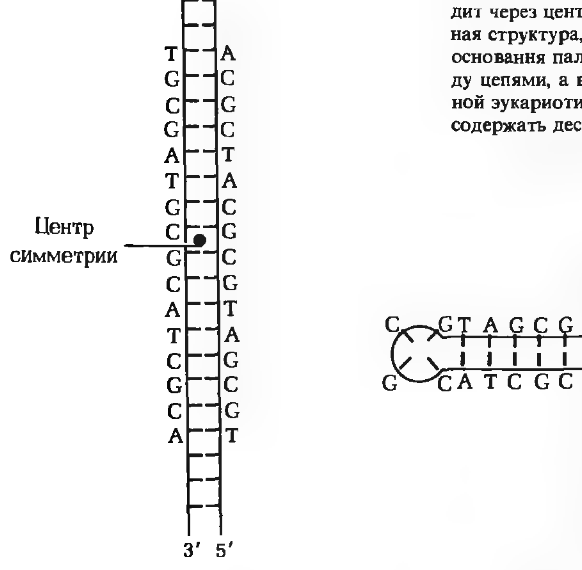


Рис. 27-28. *А*. Палиндром, или обращенный повтор. Видно, что он обладает осевой симметрией. Ось симметрии второго порядка проходит через центральную точку. *Б*. Крестообразная структура, возникающая в том случае, если основания палиндрома образуют пары не между цепями, а внутри каждой из цепей. В нативной эукариотической ДНК палиндромы могут содержать десятки и даже сотни оснований.

27.27. Эукариотическая ДНК содержит большое число палиндромов

У эукариотической ДНК есть еще одна характерная особенность, которая состоит в том, что она содержит множество (возможно, тысячи) палиндромов. Палиндром (от греч. «бежать назад»)–это слово или предложение, которое одинаково читается как слева направо, так и справа налево. Вот два примера[1]:

Able was I ere I saw Elba
Madam, in Eden I'm Adam.

Слово палиндром используется в биохимической генетике для обозначения участков эукариотической ДНК, в которых обнаруживаются *обращенные повторы* нуклеотидных последовательностей с осевой симметрией второго порядка, напоминающие короткие последовательности, узнаваемые рестриктирующими эндонуклеазами. Пример такого участка приведен на рис. 27-28.

Размеры многих палиндромов достигают тысячи пар оснований. Более короткие палиндромы, так же как и в случае ре-

[1] Поскольку приведенные два палиндрома невозможно перевести, мы даем в качестве примеров два палиндрома на русском языке, составленных сотрудником Института биофизики АН СССР Б. Гольдштейном: Уж редко рукою окурок держу. Умер и мир ему.

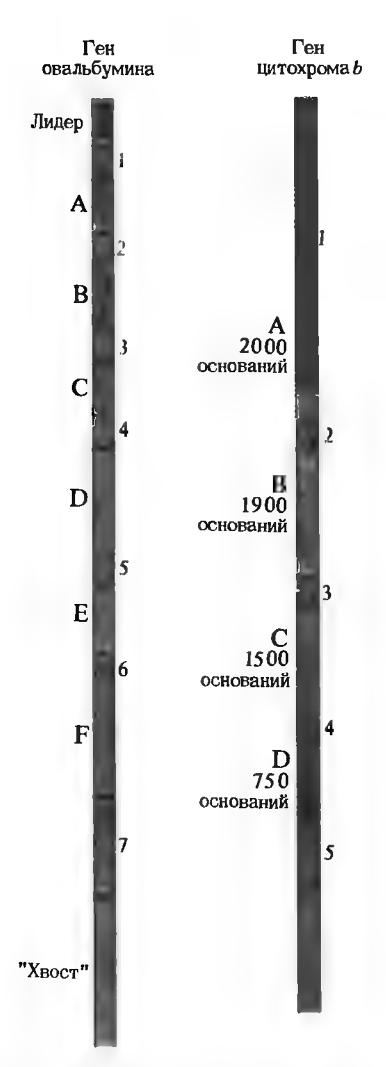


Рис. 27-29. Вставочные последовательности (интроны) в двух эукариотических генах. Ген овальбумина содержит шесть интронов (они обозначены серым цветом и буквами *A–F*) и, следовательно, разделен на семь участков, или экзонов (указаны красным цветом и цифрами *1–7*). В гене цитохрома *b* присутствуют четыре интрона (серые, *A–D*) и пять экзонов (красные, *1–5*). В обоих случаях интроны составляют бóльшую часть ДНК гена. Указано число оснований, входящих в состав интронов гена цитохрома *b*.

стриктируемых последовательностей, выполняют роль особых сигналов. Длинные палиндромы способны образовывать крестообразные структуры за счет спаривания оснований внутри каждой из двухцепочечных петель (рис. 27-28). Функция длинных палиндромов пока неизвестна.

27.28. Многие эукариотические гены содержат вставочные нетранслируемые последовательности (интроны)

Многие эукариотические гены (может быть, даже большинство их) обладают весьма загадочной структурной особенностью, которая состоит в том, что в их нуклеотидную последовательность вставлен участок ДНК, не кодирующий аминокислотную последовательность полипептидного продукта. Эти нетранслируемые вставки прерывают строго коллинеарное соответствие между нуклеотидной последовательностью остальных участков гена и аминокислотной последовательностью полипептида, кодируемого этим геном (рис. 27-29). Такие нетранслируемые участки ДНК в генах называют *вставочными последовательностями, или интронами*, тогда как участки гена, кодирующие аминокислотную последовательность полипептида, называют *экзонами*. Хорошо известным примером может служить ген, кодирующий единственную полипептидную цепь яичного белка – *овальбумина*. На рис. 27-29 видно, что в этом гене присутствуют шесть интронов, которые разделяют ген овальбумина на семь экзонов. Видно также, что интроны в этом гене гораздо длиннее экзонов – суммарная длина всех интронов составляет 85% общей длины ДНК гена. За немногими исключениями, *все изученные к настоящему времени эукариотические гены содержат интроны, которые различаются по числу, по месту расположения, а также по тому, какую часть общей длины гена они занимают*. Например, ген сывороточного альбумина содержит 6 интронов, ген белка кональбумина куриных яиц – 17 интронов, а ген коллагена – свыше 50 интронов. Исключение составляют гены гистонов, которые, по-видимому, не содержат интронов.

Смысл существования интронов до конца не ясен и служит предметом множества гипотез. Одно из предположений

заключается в том, что интроны играют роль регуляторных сигналов. Согласно другой гипотезе, интроны разделяют гены на отдельные, способные обмениваться участки («мини-гены»), которые могут рекомбинировать в ходе эволюции вида с образованием новых генов. Какова бы ни была функция интронов, очевидно, их исследование поможет решить ряд проблем, связанных с транскрипцией генов (гл. 28).

27.29. Нуклеотидные последовательности некоторых ДНК уже расшифрованы

В 1977 г. была определена полная нуклеотидная последовательность ДНК бактериофага фХ174 (с. 850). Это выдающееся достижение ознаменовало собой начало новой эры в биохимии генов и хромосом. С тех пор была расшифрована нуклеотидная последовательность целого ряда генов, и в настоящее время, по крайней мере в принципе, можно определить последовательность оснований, по-видимому, любой ДНК.

До 1977 г. была расшифрована нуклеотидная последовательность многих тРНК и нескольких небольших мРНК. Роберт Холли и его коллеги первыми определили нуклеотидную последовательность нуклеиновой кислоты – дрожжевой аланиновой тРНК. Это исследование, завершенное в 1965 г., потребовало нескольких лет работы. Хотя молекулы тРНК состоят менее чем из 100 нуклеотидных остатков, они содержат много необычных модифицированных оснований, которые необходимо было идентифицировать. При секвенировании (т. е. определении нуклеотидной последовательности) ДНК возникают также и другие трудности. Мы уже упоминали, что в среднем ген *E. coli* состоит из 1200 нуклеотидных пар, а целая молекула ДНК бактериофага фХ174 – более чем из 5000 пар. Раньше не было методов, позволяющих избирательно расщеплять ДНК по определенному нуклеотиду – скажем, по всем остаткам А. Даже если бы такой метод существовал, при расщеплении образовался бы очень большой набор фрагментов меньшего размера, которые чрезвычайно трудно было бы разделить. Более того, если бы даже удалось разделить и секвенировать эти фрагменты, восстановить из них полную последовательность оказалось бы практически невозможным.

Решающий успех был достигнут благодаря трем основным достижениям. Первым из них явилось открытие рестриктирующих эндонуклеаз, которые расщепляют молекулы ДНК только в сравнительно небольшом числе специфических точек. Использование двух или большего числа рестриктирующих эндонуклеаз (табл. 27-7) позволило расщеплять молекулы ДНК на отдельные фрагменты разными способами с образованием перекрывающихся последовательностей – точно так же, как применение двух различных протеолитических ферментов (например, трипсина и химотрипсина) открыло в свое время возмож-

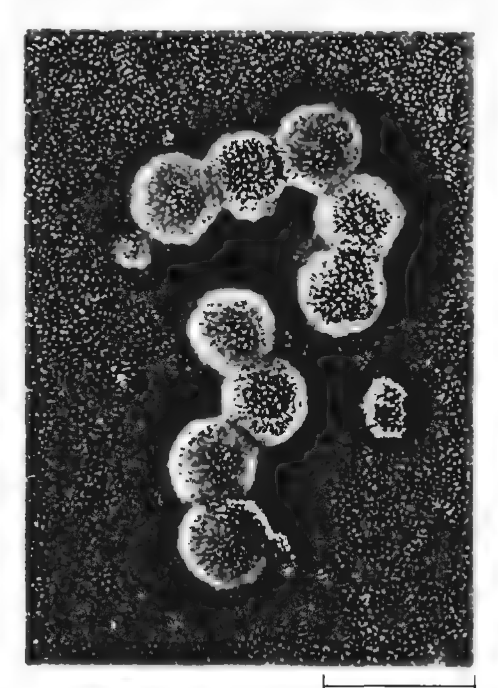


Рис. 27-30. Обезьяний вирус 40 (SV40) вызывает рак у хомячков и других мелких животных. Он представляет собой один из самых мелких канцерогенных вирусов. Белковая оболочка SV40 имеет форму икосаэдра, т. е. двадцатигранника.

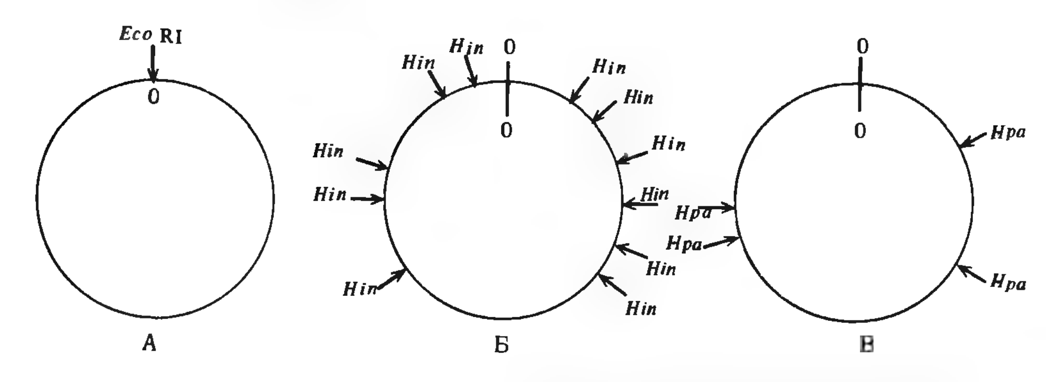


Рис. 27-31. Сайты рестрикции кольцевой молекулы ДНК SV40 для трех разных рестриктирующих эндонуклеаз – *Eco* RI, *Hin* и *Hpa* I, каждая из которых узнает и катализирует расщепление двойной спирали в определенных участках. *A*. *Eco* RI расщепляет обе цепи кольцевой ДНК SV40 только в одном сайте, переводя ее в линейную форму. Этот сайт приият за точку отсчета. От него определяют положение сайтов рестрикции ДНК SV40 для других рестриктирующих эндонуклеаз. *Б*. *Hin* (смесь *Hin* dII и *Hin* dIII) расщепляет ДНК в одиннадцати сайтах с образованием двенадцати фрагментов. *В*. *Hpa* I расщепляет ДНК всего в четырех местах с образованием пяти фрагментов. Данные ферменты были первыми рестриктирующими эндонуклеазами, которые Даниэль Натанс и его коллеги применили для картирования генов в ДНК SV40. Сейчас уже известны сайты рестрикции генома SV40 для множества других эндонуклеаз.

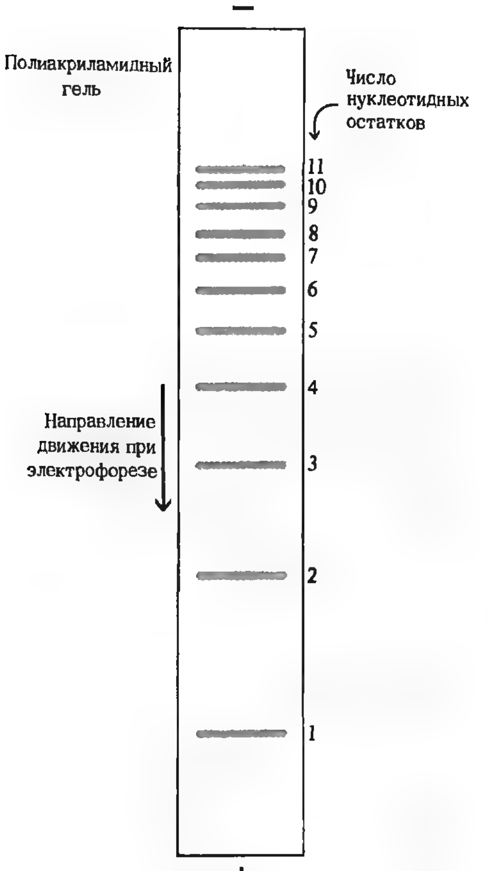


Рис. 27-32. Электрофоретическое разделение олигонуклеотидов по длине цепи на пластинке полиакриламидного геля. Чем короче олигонуклеотиды, тем быстрее они движутся к положительному электроду. Изменяя пористость полиакриламидного геля, данную процедуру можно использовать для разделения довольно длинных олигонуклеотидов, содержащих до двухсот и более остатков, даже если эти олигонуклеотиды различаются всего лишь одним остатком.

ность расщеплять полипептидные цепи на разные наборы фрагментов и устанавливать аминокислотные последовательности в перекрывающихся участках (разд. 6.7, *е*). Например, ДНК обезьяньего вируса 40 (SV40) (рис. 27-30), способного превращать некоторые клетки в злокачественные, была расщеплена рестриктирующими эндонуклеазами в ряде специфических точек с образованием фрагментов, удобных для определения локализации отдельных генов. На рис. 27-31 схематически показаны сайты расщепления ДНК SV40 с помощью трех рестриктирующих эндонуклеаз.

Вторым важным достижением оказа-

лось усовершенствование электрофоретических методов разделения фрагментов ДНК в соответствии с числом содержащихся в них нуклеотидных остатков. Эти методы обладают настолько высоким разрешением, что позволяют разделять фрагменты ДНК размером до 200 нуклеотидов, даже если они отличаются друг от друга по длине всего лишь на один нуклеотид (рис. 27-32).

Третьим достижением стала разработка методов клонирования ДНК (гл. 30), которые сделали возможным получение достаточно больших количеств чистых генов – исходного материала для секвенирования. Было предложено два принципиальных подхода к секвенированию ДНК, у каждого из которых есть ряд вариантов. Фредерик Сэнгер, первым определивший аминокислотную последовательность белка, а именно инсулина (разд. 6.8), стал также первым ученым, установившим нуклеотидную последовательность в молекуле ДНК (бактериофага φX174); произошло это в 1977 г. Сэнгер и его коллеги разработали очень изящную процедуру – метод терминации цепей, или, как его еще называют, «плюс-минус»-систему. Независимо от них Алан Максам и Уолтер Гилберт из США предложили несколько другой подход, получивший название химического метода. В обоих подходах используются фрагменты, полученные при расщеплении исходной ДНК с помощью рестриктирующих эндонуклеаз. В дополнении 27-1 описаны принципы метода определения нуклеотидной последовательности, разработанного Максамом и Гилбертом.

Дополнение 27-1. Секвенирование короткого фрагмента ДНК при помощи химического метода Максама–Гилберта

В приведенном ниже описании опущены некоторые детали для того, чтобы сконцентрировать внимание на основном принципе метода. Предположим, что у нас есть полученный в результате действия рестриктирующей эндонуклеазы фрагмент ДНК размером в 10 нуклеотидных остатков с последовательностью

5′-конец 3′-конец

G-A-T-C-A-G-C-T-A-G

Первый этап состоит во введении радиоактивной метки в 5′-концевой остаток (G), который показан на красном фоне:

G-A-T-C-A-G-C-T-A-G

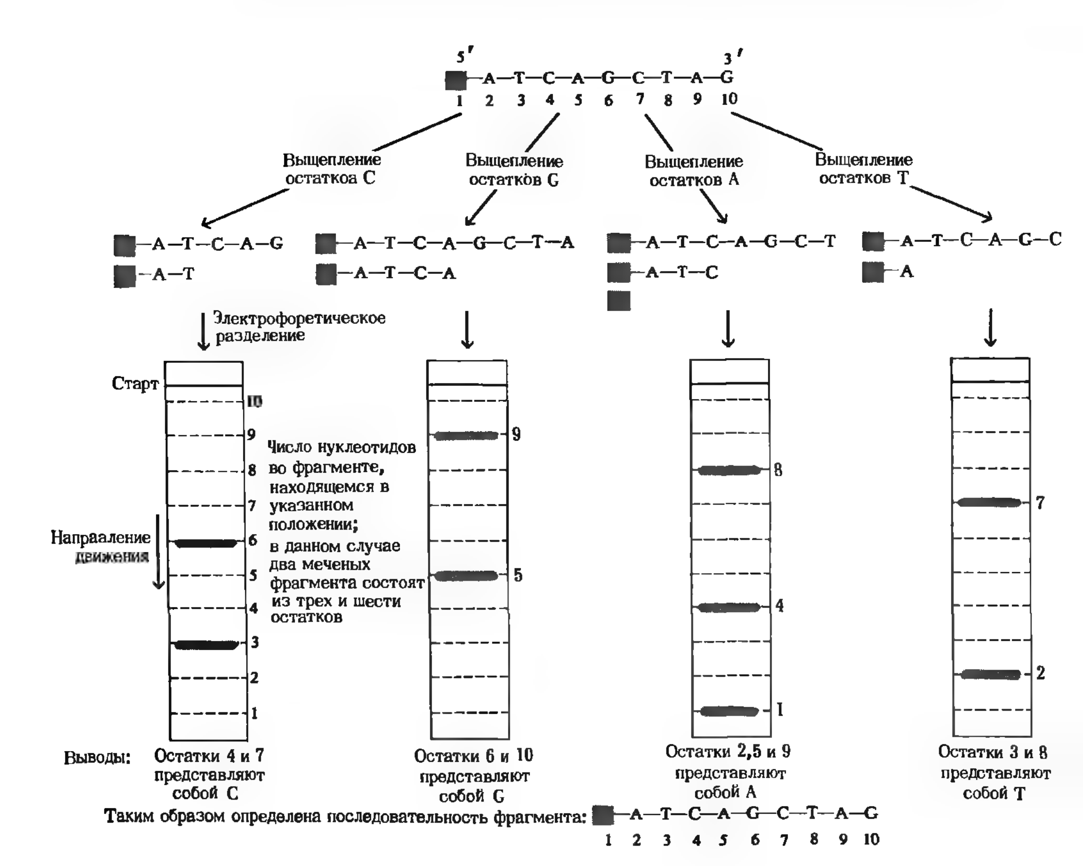
После этого меченный по 5′-положению олигонуклеотид распределяют на четыре порции. Первую из них подвергают химической обработке, в результате которой олигонуклеотид распадается на небольшие куски за счет статистического выщепления остатков С. При таком расщеплении олигонуклеотида по С может получиться следующая смесь:

G-A-T-C-A-G
T-A-G
G-A-T
A-G-C-T-A-G
A-G

В этом наборе фрагментов меченый 5'-концевой остаток показан на красном фоне. Обратите внимание на то, что два фрагмента помечены, а это значит, что они содержат 5'-конец исходного олигонуклеотида, в то время как фрагменты Т—А—G, А—G—С—Т—А—G и А—G не содержат метки, т.е. в них отсутствует исходный 5'-конец. Нас будут интересовать только меченые фрагменты.

Вторую порцию исходного меченого олигонуклеотида подвергают другой химической обработке, в результате которой выщепляются только остатки G, что приводит к образованию другого набора меченых фрагментов (рис. 1). Такую же обработку претерпевает и третья порция исходного меченого олигонуклеотида, который фрагментируется в результате выщепления только остатков А. Аналогичным образом, четвертую порцию расщепляют благодаря удалению только остатков Т. В конце концов имеют четыре различные смеси меченых фрагментов, полученные с помощью четырех разных химических процедур (рис. 1).

Каждую из четырех смесей фрагментов подвергают электрофорезу на пластинке геля в условиях, обеспечивающих разделение фрагментов в соответствии с числом содержащихся в них нуклеотидных остатков независимо от того, какие это остатки. При таком разделении фрагменты будут двигаться тем быстрее, чем они меньше. Точное положение каждого меченого фрагмента в геле определяют радиоавтографией. Положения меченых фрагментов в каждом из



вариантов расщепления показаны на рис. 1. Положения немеченых фрагментов при этом не обнаруживаются, но эти фрагменты и не нужны для расшифровки последовательности.

На рис. 1 результаты первого способа фрагментации, в котором выщеплялись остатки С, сопоставлены с электрофоретической картиной, показывающей расположение полученных при этом способе фрагментов длиной от 1 до 10 остатков. Здесь было обнаружено два меченых фрагмента. Очевидно, это именно те фрагменты, которые содержат 5′-конец исходного олигонуклеотида. Меченые фрагменты найдены в положениях, соответствующих олигонуклеотидам длиной в три и шесть остатков. Ясно, что в исходном нуклеотиде после этих меченых фрагментов в направлении к 3′-концу стоял остаток С, поскольку в химической процедуре, приведшей к расщеплению исходного олигонуклеотида, выщеплялся только этот остаток. Таким образом, в результате первой химической обработки мы узнали, что в положениях 4 и 7 (отсчитывая с 5′-конца) исходного олигонуклеотида должны располагаться остатки С.

Теперь точно так же поступают с тремя другими наборами фрагментов, полученными в результате специфического выщепления соответственно остатков G, А и Т из исходного олигонуклеотида (рис. 1). На схеме мы видим, что меченые фрагменты, полученные при выщеплении остатков G, движутся со скоростью, соответствующей олигонуклеотидам длиной в 5 и 9 нуклеотидных звеньев; таким образом, остатки 6 и 10 в исходном олигонуклеотиде должны быть G. Из третьего набора фрагментов, полученного удалением А, следует, что в положениях 2, 5 и 9 были остатки А; четвертый набор фрагментов, полученный выщеплением остатка Т, указывает на присутствие остатков Т в положениях 3 и 8. В нижней части рис. 1 дана нуклеотидная последовательность, установленная с помощью этой простой процедуры и некоторых рассуждений. Этим методом часто быстрее чем за 2 дня может быть определена нуклеотидная последовательность олигонуклеотидов, содержащих 200 и даже большее число остатков.

Чтобы расшифровать нуклеотидную последовательность целой молекулы ДНК, сначала ее фрагментируют с помощью рестриктирующей эндонуклеазы. Затем каждый из образовавшихся фрагментов секвенируют по отдельности по схеме, приведенной на рис. 1. Во второй аликвоте исходную ДНК расщепляют в других местах, используя другую рестриктирующую эндонуклеазу, и получают второй набор фрагментов. После того как секвенирование всех фрагментов второго набора завершено, сравнение двух наборов дает возможность найти участки перекрывания, необходимые для сборки фрагментов первого набора в правильном порядке. В результате может быть установлена нуклеотидная последовательность интересующей нас природной ДНК. Иногда, для того чтобы устранить неясности в некоторых участках последовательности, оставшиеся после первых двух расщеплений, приходится анализировать третий или четвертый наборы фрагментов.

Краткое содержание главы

Роль ДНК как носителя генетической информации подтверждается целым рядом фактов. Эксперимент Эвери, Мак-Леода и Мак-Карти показал, что ДНК, выделенная из одного штамма бактерий, способна проникнуть в клетки другого штамма и трансформировать их, придавая им некоторые наследуемые признаки донора. Опыт Херши и Чейз продемонстрировал, что именно ДНК бактериофага, а не его белковая оболочка несет генетическое сообщение для репликации вируса в клетке-хозяине. Все соматические клетки организма данного вида содержат ДНК с одинаковым нуклеотидным составом, который не зависит ни от питания, ни от условий окружающей среды. Хотя нуклеотидный состав ДНК у разных видов различен, в двухцепочечных ДНК всех видов число остатков аденина всегда равно числу остатков тимина, а число гуаниновых остатков всегда равно числу цитозиновых остатков.

На основании рентгеноструктурного анализа волокон ДНК и принципа комплементарности оснований в ДНК Уотсон и Крик пришли к заключению, что нативная ДНК состоит из двух антипараллельных цепей, скрученных в двойную спираль. Комплементарные основания A—T и G—C образуют с помощью водородных связей пары внутри спирали, а гидрофильный сахарофосфатный остов располагается с наружной стороны макромолекулы. Пары оснований плотно уложены в стопку перпендикулярно длинной оси на расстоянии 0,34 нм друг от друга; на один полный виток двойной спирали приходится приблизительно 10 нуклеотидных пар оснований. Комплементарность цепей в двойной спирали позволяет понять механизм их точной репликации.

При нагревании или при экстремальных значениях pH нативная ДНК обратимо расплетается и ее цепи разделяются. Поскольку пары оснований G≡C более стабильны, чем пары A=T, точка плавления ДНК, богатой парами G≡C, выше точки плавления ДНК с большим содержанием пар A=T. Денатурированная одноцепочечная ДНК из одного вида может образовать гибридный дуплекс с денатурированной одноцепочечной ДНК из другого вида при условии, что нуклеотидные последовательности этих двух цепей имеют хотя бы некоторое сходство (гомологию). На основании эффективности образования таких гибридов судят о возможном родстве разных видов и о гомологии между ДНК и РНК.

У ДНК-содержащих вирусов бактерий единственная двухцепочечная молекула ДНК может быть либо замкнутой в кольцо, либо линейной; некоторые вирусные ДНК, например ДНК φX174,– это одноцепочечные молекулы. Вирусные ДНК сверхспирализованы, что облегчает их плотную упаковку внутри вириона. Единственная хромосома бактерий представляет собой значительно больший по размеру, ковалентно замкнутый кольцевой дуплекс. Бактериальная ДНК свернута с образованием большого числа петель, каждая из которых сверхспирализована. Эукариотические клетки содержат много хромосом, причем каждая хромосома представляет собой одну очень длинную линейную молекулу ДНК, в 4–100 раз превосходящую по длине единственную хромосому прокариот. Эукариотическая ДНК обматывает белковые частицы, состоящие из нескольких молекул основных белков – гистонов, которые располагаются вдоль ДНК через определенные интервалы. Такие комплексы участков ДНК и гистонов называются нуклеосомами.

Структурные гены – это участки ДНК, которые кодируют полипептидные цепи, тРНК и рРНК. Вирусные ДНК содержат сравнительно небольшое число генов в отличие от ДНК *E. coli*, содержащей более 3000 генов. К настоящему времени расположение многих из них в кольцевой хромосоме уже установлено. Бактерии защищают свою собственную ДНК путем метилирования некоторых оснований, расположенных в определенных местах молекулы, с помощью модифицирующих метилаз. При

этом чужеродная ДНК, не имеющая этих «опознавательных» метильных групп, разрушается рестриктирующими эндонуклеазами. В эукариотических ДНК присутствует большое число высокоповторяющихся коротких последовательностей, меньшее число более длинных умеренных повторов, которые, как полагают, играют регуляторную роль, и ряд уникальных (неповторяющихся) участков, представляющих собой, видимо, структурные гены. Эукариотические гены содержат вставочные нетранслируемые нуклеотидные последовательности, называемые интронами, которые вставлены между транслируемыми участками, называемыми экзонами. С помощью недавно разработанных методов были определены нуклеотидные последовательности ряда генов и вирусных ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

Общие вопросы

Ayala F., Kiger J. Modern Genetics, Benjamin-Cummings, Menlo Park, Calif., 1980. Прекрасное описание основ генетики.

Kornberg A. DNA Replication, Freeman, San Francisco, 1980. Всеобъемлющая и авторитетная монография.

Упаковка

Bauer W.R., Crick F.H.C., White J.H. Supercoiled DNA, Sci. Am., **243**, 118-133, July 1980.

Плазмиды

Novick R.P. Plasmids, Sci. Am., **243**, 102-127, Decemberg 1980.

Ферменты рестрикции–модификации

Nathans D. Restriction Endonucleases, Simian 40, and the New Genetics, Science, **206**, 903-909 (1979).

Smith H. Nucleotide Sequence Specificity of Restriction Endonucleases, Science, **205**, 455-462 (1979).

Выделение и синтез генов

Khorana H.G. Total Synthesis of a Gene, Science, **203**, 614-625 (1979).

Повторяющиеся последовательности

Britten R.J., Kohne D.E. Repeated Segments of DNA, Sci. Am., **222**, 24-31, April 1970.

Davidson E.H., Britten R.J. Possible Role of Repetitive Sequences, Science, **204**, 1052-1059 (1979).

Вставочные последовательности

Catterall J.F., colleagues. The Chick Ovomucoid Gene Contains at Least Six Intervening Sequences, Science, **204**, 264-271 (1979).

Crick F. Split Genes and RNA Splicing, Science, **204**, 264-271 (1979).

Хроматин и нуклеосомы

Kornberg R.D., Klug A. The Nucleosome, Sci. Am., **244**, 52-78, February 1981.

Olins D.E., Olins A.L. Nucleosomes: The Quantum Beyond DNA, Am. Sci., **66**, 704-711 (1978).

Нуклеотидная последовательность ДНК

Fiddes J.C. The Nucleotide Sequence of a Viral DNA, Sci. Am., **237**, 55-67, December 1977. Прекрасное описание того, как была расшифрована нуклеотидная последовательность ДНК фX174.

Maxam A.M., Gilbert W. A New Method for Sequencing DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **74**, 560-564 (1977).

Reddy V.B., colleagues. The Genome of Simian Virus 40, Science, **200**, 494-502 (1978).

Sanger F. Determination of Nucleotide Sequences in DNA, Biosci. Repts., **1**, 3-18 (1981).

Исторические вопросы

Gairns J., Stent G., Watson J.D. (eds.). Phage and the Origins of Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1966. Рассказ о начальных этапах развития молекулярной генетики и о некоторых людях, которые способствовали ее расцвету.

Judson H. The Eighth Day of Creation, Simon and Schuster, New York, 1979.

Olby R. The Path to the Double Helix, University of Washington Press, Seattle, 1974.

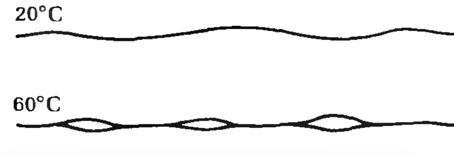
Watson J.D. The Double Helix, Atheneum, 1968. Рассказ об истории открытия двойной спирали ДНК.

Вопросы и задачи

1. *Спаривание оснований в ДНК.* В препаратах ДНК, выделенных из двух неидентифицированных видов бактерий, содержание аденина составляет соответственно 32 и 17% общего содержания оснований. Какие относительные количества аденина, тимина и цитозина вы предполагаете найти в этих двух препаратах ДНК? Какие вы

сделали допущения? Одна из этих бактерий была выделена из горячего источника (64°С). Какая из ДНК принадлежит термофильной бактерии? На чем основывается ваш ответ?

2. *Нуклеотидная последовательность комплементарных цепей ДНК.* Напишите нуклеотидную последовательность одной цепи двухцепочечной ДНК, другая цепь которой имеет последовательность (5′) ATGCCGTATGCATTC (3′).
3. *ДНК человека.* Чему равен вес молекулы двухцепочечной ДНК (в граммах) протяженностью от Земли до Луны (~384000 км)? Каждая тысяча нуклеотидных пар двойной спирали ДНК весит $1 \cdot 10^{-18}$ г. В одном километре содержится $1 \cdot 10^{12}$ нм, а размер одной пары оснований составляет 0,34 нм. Для сравнения интересно отметить, что в организме человека содержится ~0,5 г ДНК!
4. *Какова длина гена рибонуклеазы?* Какое минимальное число нуклеотидных пар содержится в гене, кодирующем панкреатическую рибонуклеазу (124 аминокислоты)? Почему число нуклеотидных пар может оказаться гораздо бóльшим, чем в вашем ответе? С чем связана такая неопределенность?
5. *Упаковка ДНК в вирусе.* Молекулярная масса ДНК бактериофага Т2 равна $130 \cdot 10^6$. Головка фага имеет размер 100 нм. Считая, что молекулярная масса одной пары оснований равна 660, определите длину ДНК фага Т2 и сравните ее с размером головки фага. Ваш ответ покажет необходимость очень компактной укладки ДНК в вирусах.
6. *Упаковка ДНК в эукариотических клетках.* Сравните длину ДНК в одной нуклеосоме с диаметром нуклеосомы, который равен 10–11 нм. Затем сравните длину всей ДНК в клетке человека с диаметром клеточного ядра – около 2 мкм. В какой из структур ДНК уложена более компактно?
7. *Палиндром.* Насколько вероятно, что палиндром, изображенный на рис. 27-28, самопроизвольно примет показанную на этом рисунке крестообразную структуру в изолированной чистой ДНК. Каким мог бы быть ваш ответ, если бы этот палиндром находился в хромосоме интактной клетки?
8. *ДНК фага М13.* ДНК бактериофага М13 имеет следующий нуклеотидный состав: А – 23%, Т – 36%, G – 21%, С – 20%. Что говорят вам эти цифры о ДНК данного фага?
9. *Разделение ДНК в градиенте плотности.* Центрифугирование в щелочном сахарозном градиенте позволяет разделять смесь разных ДНК в соответствии с размерами и формой их макромолекул, но при этом происходит денатурация ДНК. С помощью этого метода можно отличать линейную форму ДНК от кольцевой и определять относительные размеры фрагментов ДНК. Репликативная форма II (РФII) ДНК фага φX174 представляет собой двухцепочечное кольцо с разрывом в одной из цепей.
   а) Какого типа и какой длины молекулы должны выявляться при центрифугировании РФII ДНК в щелочном сахарозном градиенте? (В молекуле ДНК φX174 содержится 5386 пар оснований.)
   б) Какого типа и какой длины молекулы будут обнаружены, если РФII ДНК сначала обработать рестриктирующей эндонуклеазой, расщепляющей РФII только в одном сайте?
10. *Нуклеотидная последовательность ДНК.* Почему при секвенировании ДНК химическим методом молекула ДНК должна быть меченой только по одному концу, а не равномерно?
11. *Нуклеотидный состав ДНК φX174.* ДНК бактериофага φX174 может находиться в двух формах: в одноцепочечной (в вирионе) и в двухцепочечной (в ходе репликации в клетке-хозяине). Как вы думаете, одинаков ли нуклеотидный состав у этих двух форм ДНК? Обоснуйте свой ответ.
12. *Размер эукариотических генов.* В печени крысы имеется фермент, в полипептидную цепь которого входит 192 аминокислотных остатка. Этот фермент кодируется геном, включающим 1440 пар оснований. Объясните взаимосвязь между числом аминокислотных остатков в ферменте и числом пар оснований в соответствующем ему гене.
13. *Видовые различия ДНК.* Если пробирки, содержащие препараты ДНК, выделенные из *E. coli* и из морского ежа (табл. 27-3), будут случайно перепутаны, то как вы определите, где какой препарат?
14. *«Глазки» в частично денатурированной ДНК.* Образец двухцепочечной линейной ДНК, тщательно выделенной из одного вида ракообразных, нанесен на сетку при 20°С и проанализирован с помощью электронного микроскопа. Другой образец этой же ДНК предварительно выдержан при 60°С в течение 30 мин, а затем также проанализирован с помощью электронной микроскопии. Вот как схематически выглядели эти образцы:



Как вы объясните такой результат? Какую полезную информацию можно извлечь из наблюдаемого явления?

15. *Гибридизация ДНК.* На основании какой информации о структуре гомологичных белков вы можете предположить, что цепи ДНК из разных видов позвоночных будут давать двухцепочечные гибриды?

16. *Действие рестриктирующих эндонуклеаз.* Замкнутую кольцевую вирусную ДНК обрабатывают рестриктирующей эндонуклеазой. В этой ДНК есть один сайт рестрикции со следующей структурой:

5′–A–T–G–C–T–A–G–C–A–T–3′
3′–T–A–C–G–A–T–C–G–T–A–5′

а) Отметьте точкой предполагаемый центр сайта рестрикции.

б) Почему вы решили, что выбранная вами точка представляет собой центр? Каковы его свойства?

в) После расщепления обеих цепей рестриктирующей эндонуклеазой смесь нагревают, чтобы разрушить фермент, а затем медленно охлаждают. Под электронным микроскопом вирусная ДНК выглядит как кольцевая молекула. Как вы это объясните?

г) Если конечный раствор из предыдущего вопроса (п. в) подщелочить 0,1 M NaOH, то окажется, что в нем находятся лишь одиночные линейные цепи ДНК. Как вы объясните этот факт?

17. *РНК-содержащие вирусы: могут ли гены состоять из РНК?* В составе РНК-содержащих вирусов *E. coli* ДНК нет, в них присутствует лишь РНК, которая выполняет роль вирусной хромосомы. Это означает, что в таких вирусах гены состоят из РНК, а не из ДНК. Опровергает ли это центральную догму молекулярной генетики? Обоснуйте свой ответ.

ГЛАВА 28

РЕПЛИКАЦИЯ И ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК

Теперь, когда мы изучили структуру ДНК и природу хромосом и генов, посмотрим, как происходит репликация ДНК с образованием дочерних молекул и транскрипция с образованием комплементарных ей РНК.

Ферменты и прочие белки, участвующие в процессах репликации и транскрипции ДНК, относятся к числу самых замечательных из всех известных биологических катализаторов. Они способны создавать эти гигантские макромолекулы из мононуклеотидов-предшественников, используя энергию фосфатной группы, и с исключительной точностью осуществлять перенос генетической информации от матрицы к новосинтезируемой цепи. Кроме того, при работе этих ферментов должны решаться сложные механические проблемы, поскольку, прежде чем в дело вступят реплицирующие ферменты, должно произойти расплетание родительской двухцепочечной ДНК так, чтобы ферменты могли получить доступ к информации, закодированной в последовательности оснований внутри двойной спирали. Более того, в эукариотических клетках система репликации тесно связана со сложной трехмерной организацией хроматина и нуклеосом.

Ферменты транскрипции также обладают необычными свойствами. Они способны не только катализировать синтез широкого набора различных РНК, но и начинать и заканчивать свое действие в особых точках хромосомы, реагируя на разнообразные регуляторные сигналы. В результате согласованного действия ферментов на определенных этапах жизненного цикла клетки транскрибируются только определенные гены. Таким образом, ДНК- и РНК-полимеразы, как, впрочем, и другие белки, помогающие осуществлять репликацию и транскрипцию ДНК, жизненно важны для сохранения в поколениях генетической информации.

28.1. ДНК реплицируется полуконсервативным способом

Согласно гипотезе Уотсона–Крика, каждая из цепей двойной спирали ДНК служит матрицей для репликации комплементарных дочерних цепей. При этом образуются две дочерние двухцепочечные молекулы ДНК, идентичные родительской ДНК, причем каждая из этих молекул содержит одну неизмененную цепь родительской ДНК. Гипотеза Уотсона–Крика была проверена с помощью остроумных опытов, выполненных Мэтью Мезельсоном и Франклином Сталем в 1957 г. Основная идея этих опытов иллюстрируется схемой, приведенной на рис. 28-1. Клетки *E. coli* выращивали в течение ряда поколений в среде, содержащей в качестве источника азота хлористый аммоний (NH_4Cl), в котором обычный распространенный изотоп [^{14}N] был заменен на «тяжелый» изотоп [^{15}N]. Вследствие этого все соединения клеток, имеющие в своем составе азот, в том числе и основания ДНК, оказались сильно обогащенными изотопом [^{15}N]. Плотность ДНК, выделенной из этих клеток, была приблизительно на 1% выше плотности нормальной [^{14}N] ДНК. Хотя это различие невелико, тем не менее смесь «тяжелой» [^{15}N] и «легкой» [^{14}N]

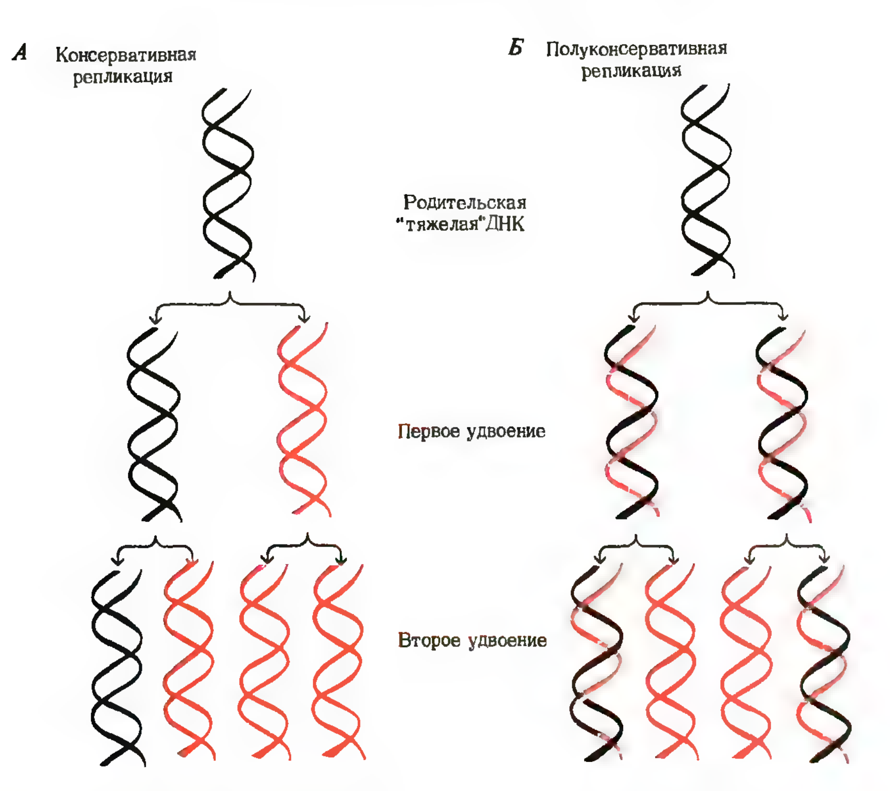


Рис. 28-1. Принцип эксперимента Мезельсона–Сталя, целью которого было выбрать один из двух возможных механизмов репликации «тяжелой» [^{15}N] ДНК (обозначена черным цветом), когда репликация происходила в среде с «легким» изотопом азота [^{14}N]. «Легкие» цепи ДНК обозначены красным цветом. *А*. Консервативный механизм репликации. Если бы репликация протекала по этому механизму, то одна из двух дочерних двухцепочечных молекул содержала бы две «легкие», а другая – две «тяжелые» цепи. Последующее удвоение дочерних молекул должно было бы привести к появлению четырех двухцепочечных молекул, одна из которых была бы «тяжелой», а три других – «легкими»; гибридные ДНК при этом не образуются. *Б*. Полуконсервативный механизм репликации. При этом типе репликации каждая из двух дочерних двухцепочечных молекул ДНК должна была бы содержать одну родительскую («тяжелую») цепь и одну «легкую» цепь. Последующее удвоение дочерних молекул приводило бы к образованию двух гибридных и двух «легких» молекул ДНК.

ДНК удалось разделить методом центрифугирования в концентрированном растворе хлористого цезия. Хлористый цезий использовали потому, что плотность его водного раствора может быть сделана достаточно близкой к плотности ДНК. Если такой раствор CsCl долго центрифугировать в высокоскоростной ультрацентрифуге, то через некоторое время достигается состояние равновесия, при котором в пробирке образуется непрерывный градиент плотности CsCl. Благодаря сильному гравитационному полю, создаваемому центрифугой, концентрация CsCl и соответственно плотность раствора у дна пробирки оказывается более высокой, чем наверху. Препарат ДНК, растворенный в CsCl, приходит в равновесное состояние в том месте пробирки, в котором плотность ДНК равна плотности раствора CsCl. Поскольку [^{15}N] ДНК чуть тяжелее, чем [^{14}N] ДНК, полоса, в которой она достигает равновесия в градиенте CsCl, расположена ближе ко дну пробирки, чем полоса с [^{14}N] ДНК (рис. 28-2).

Мезельсон и Сталь перенесли клетки *E. coli*, росшие на среде с [^{15}N] и содержащие «тяжелые» цепи ДНК, на свежую среду, в которой находился NH_4Cl с обычным изотопом [^{14}N]. На этой среде они выращивали клетки в течение времени,

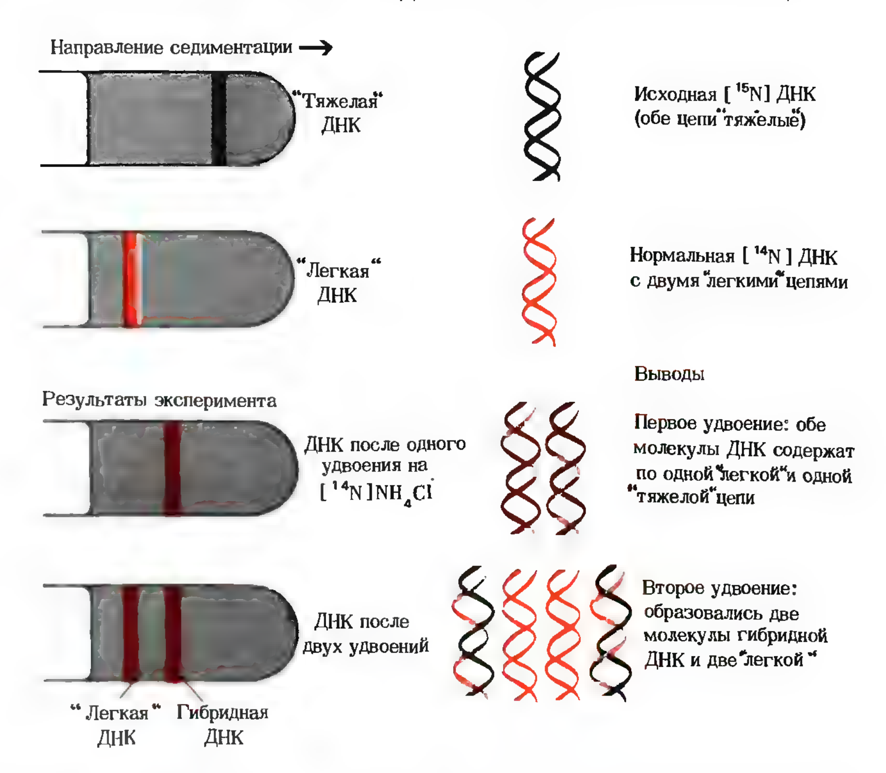


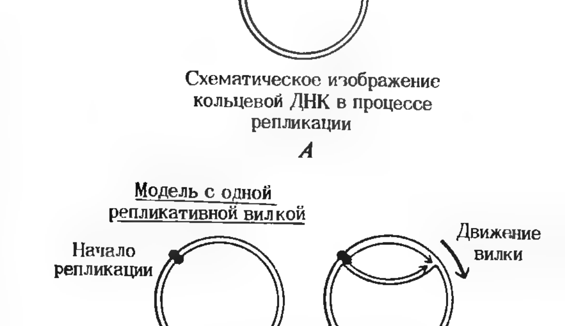
Рис. 28-2. Результаты эксперимента Мезельсона–Сталя. В градиенте плотности CsCl «тяжелая» [^{15}N]ДНК достигает равновесия в полосе, которая расположена ближе ко дну пробирки, чем полоса равновесия «легкой» [^{14}N]ДНК. Равновесное положение гибридной ДНК оказывается промежуточным. Определение плотности дочерних ДНК после первого и второго удвоений показало, что репликация ДНК осуществляется по полуконсервативному механизму.

необходимого для удвоения клеток. Затем из этих клеток выделяли ДНК и анализировали ее плотность с помощью описанного выше метода седиментации. В градиенте CsCl была обнаружена лишь одна полоса ДНК, плотность которой оказалась средней между плотностью нормальной «легкой» [^{14}N] ДНК и плотностью «тяжелой» [^{15}N] ДНК (рис. 28-2). Именно такого результата и следовало ожидать, если двухцепочечная ДНК дочерних клеток содержит одну старую ^{15}N-цепь от родительской ДНК, и одну новую ^{14}N-цепь (рис. 28-2).

Если выделить ДНК из клеток, которые прошли два цикла удвоения на среде с [^{14}N], то она разделится на две полосы: одна с плотностью, соответствующей плотности нормальной легкой ДНК, а другая с плотностью гибридной ДНК, наблюдавшейся после первого удвоения клеток. На основании этих данных Мезельсон и Сталь пришли к выводу, что в строгом соответствии с гипотезой Уотсона–Крика каждый дочерний дуплекс ДНК после двух циклов удвоения клеток содержал одну родительскую и одну новообразованную цепь ДНК. Такой механизм репликации назвали *полуконсервативным*, поскольку в каждой дочерней ДНК сохраняется лишь одна родительская цепь (рис. 28-1 и 28-2). Полученные результаты полностью исключили *консервативный способ репликации*, при котором одна дочерняя ДНК должна была бы содержать обе исходные цепи, а другая состояла бы из двух новосинтезированных цепей. Опыт Мезельсона и Сталя позволил также отвергнуть так называемый *дисперсивный механизм репликации*, при котором каждая дочерняя цепь ДНК состоит из коротких участков как родительской, так и новообразованной ДНК, соединенных между собой случайным образом.

28.2. Кольцевая ДНК реплицируется в двух направлениях

Мы уже видели, что ДНК бактерий и многих ДНК-содержащих вирусов представляет собой кольцевую двойную спираль. Как только было сделано это открытие, возник вопрос о том, как реплицируется кольцевая ДНК. Расщепляется ли сначала кольцевая ДНК перед репликацией, превращаясь в линейную молекулу, или же она способна реплицироваться в виде кольца? Важные эксперименты, выполненные Джоном Кэрнсом, показали, что ДНК в неповрежденных клетках *E. coli* реплицируется, оставаясь в кольцевой форме. Кэрнс выращивал *E. coli* на среде, содержащей тимидин, меченный радиоактивным изотопом водорода–*тритием* (^{3}H). При этом ДНК в клетках *E. coli* становилась радиоактивной. Когда ее осторожно выделяли в релаксированной форме и наносили на фотографическую пластинку, радиоактивные остатки тимидина вызывали на экспонируемой пластинке образование «треков» из зерен серебра, создающих изображение молекулы ДНК. На основании этих изображений Кэрнс заключил, что интактная хромосома–это гигантское кольцо; этот вывод согласуется с полученной ранее генетическими методами кольцевой картой ДНК *E. coli*. Однако в радиоактивной ДНК, выделенной из клеток в процессе репликации, была выявлена дополнительная радиоактивная петля (рис. 28-3). Кэрнс предположил, что эта петля в ДНК возникает в результате образования двух радиоактивных дочерних цепей, комплементарных родительским цепям, по мере того как репликативная вилка движется по кольцу родительской ДНК.



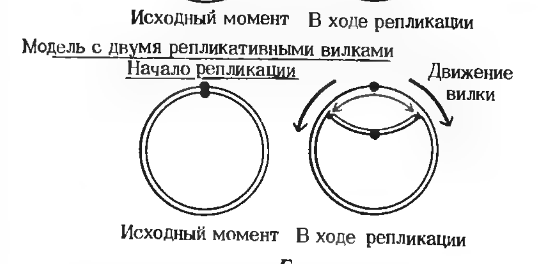


Рис. 28-3. Репликация хромосомы *E. coli*. *А*. Схематическое изображение меченной тритием хромосомы *E. coli* в ходе репликации. *Б*. Интерпретация процесса репликации (новосинтезированные дочерние цепи обозначены красным цветом). Согласно одной модели, от точки начала репликации движется только одна репликативная вилка. Согласно другой модели, в точке начала репликации возникают две репликативные вилки, которые движутся в противоположных направлениях до встречи друг с другом. Хромосомы *E. coli* и других бактерий, а также многих ДНК-содержащих вирусов реплицируются в соответствии со второй моделью.

Первоначально считали, что репликация начинается в фиксированной точке родительской ДНК (она называется точкой начала репликации) и что единственная репликативная вилка движется по кольцевой молекуле ДНК в одном направлении (рис. 28-3). Однако последующие эксперименты, проведенные на хромосомах *E. coli* и вирусов, показали, что репликация обычно происходит в двух направлениях, т.е. существуют две репликативные вилки. Обе вилки возникают в одной точке и удаляются от нее в обоих направлениях одновременно, пока снова не встретятся (рис. 28-3). В этой точке два полностью синтезированных дочерних двухцепочечных кольца разделяются: каждое из них содержит одну старую и одну новую цепь.

Участок начала репликации представляет собой нуклеотидную последовательность длиной 100–200 пар оснований, без которой ДНК не может реплици-

роваться. Эта последовательность узнается специфическими клеточными белками, которые начинают в этом месте цикл репликации. Именно этот процесс инициации репликации находится под контролем клеточной регуляции.

Исходя из скорости движения репликативной вилки *E. coli*, можно заключить, что при 37°С новая ДНК синтезируется со скоростью свыше 45 000 нуклеотидных остатков в минуту в расчете на одну вилку. Поскольку на каждый полный виток двойной спирали приходится ~ 10 пар оснований (разд. 27.6), скорость расплетания родительской ДНК в репликативной вилке у клеток *E. coli* составляет более 4500 об/мин, что превышает скорость вращения вала в двигателе автомобиля, мчащегося со скоростью 110 км/ч. По-видимому, столь быстрое расплетание должно создавать ряд механических проблем для репликации ввиду двуспиральной природы нативных молекул ДНК. Позже мы увидим, каким образом в клетке решаются эти проблемы.

28.3. В эукариотических ДНК много точек начала репликации

Очевидно, репликация эукариотической ДНК, которая организована в нуклеосомы и находится в составе хроматиновых волокон, должна быть гораздо более сложной, чем репликация бактериальной хромосомы. Чтобы выяснить, как протекает репликация ДНК у эукариот, были проведены радиоавтографические эксперименты, аналогичные опытам Кэрнса по репликации *E. coli*. Эти эксперименты показали, что эукариотическая ДНК также реплицируется в двух направлениях, но репликативные вилки движутся очень медленно, раз в 10 медленней, чем у *E. coli*. Если бы на каждую хромосому приходилась только одна пара репликативных вилок, то из-за больших размеров эукариотических ДНК их репликация продолжалась бы почти два месяца. Оказалось, что репликация эукариотической ДНК начинается одновременно во многих точках (число которых, вероятно, превышает тысячу). Из каждой такой точки одновременно в противоположных направлениях движутся две репликативные вилки (рис. 28-4), благодаря чему репликация целой эукариотической хромосомы может завершиться даже быстрее, чем репликация бактериальной хромосомы. Поскольку в эукариотической клетке хромосом много, все они должны реплицироваться одновременно. Таким образом, в ядре эукариотической клетки работает одновременно много тысяч репликативных вилок.

28.4. Иногда ДНК реплицируется по механизму «катящегося кольца»

ДНК некоторых вирусов реплицируются в одном направлении по механизму «катящегося кольца», вариант которого представлен на рис. 28-5. Вначале одна из двух цепей кольцевой родительской ДНК расщепляется ферментом. Затем к 3′-концу расщепленной цепи присоединяется несколько новых нуклеотидов. Рост новой цепи на кольцевой матрице осуществляется за счет постепенного вытеснения 5′-концевой части расщепленной цепи из катящейся кольцевой матрицы. По мере роста новой цепи вытесненный 5′-хвост становится линейной матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Этот синтез на линейной матрице продолжается до тех пор, пока не образуется дочерняя цепь ДНК, комплементарная одному обороту кольцевой матрицы. Двухцепочечный хвост отщепляется затем с помощью фермента, и на 5′-конце опять может начинаться процесс репликации. Таким путем с кольцевой матрицы может сходить множество комплементарных копий кольцевой ДНК. Механизм «катящегося кольца» используется в ооцитах в процессе синтеза генов рРНК; он позволяет получать большое число копий этих генов, расположенных в тандемной последовательности, что в свою очередь дает возможность синтезировать одновременно много рРНК. Этот механизм необходим ооцитам для того, чтобы производить много рибосом для быстрого синтеза клеточных белков в процессе ускоренно-

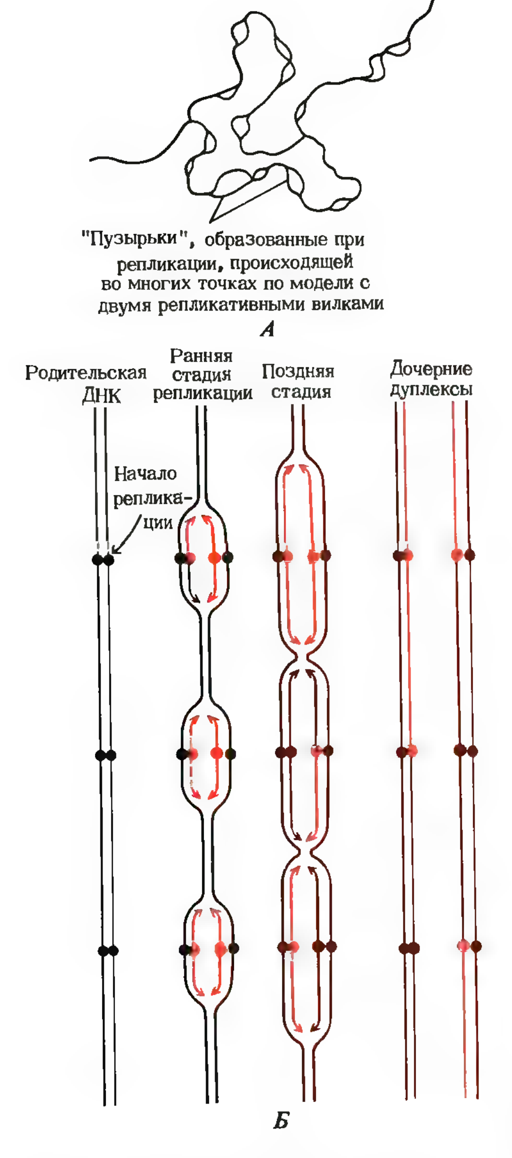


Рис. 28-4. Репликация эукариотической хромосомы. *А*. Схематическое изображение реплицирующегося участка ДНК из яиц *Drosophila melanogaster*. Видны «пузырьки», или «глазки», которые образуются при репликации, происходящей во многих точках в соответствии с моделью с двумя репликативными вилками. *Б*. Одновременно во множестве точек (точки начала репликации) возникают две репликативные вилки. Репликация продолжается до полного завершения синтеза дочерних цепей (обозначены красным цветом). Затем новые дуплексы разделяются; каждый из них содержит одну родительскую цепь (черная) и одну дочернюю цепь (красная).

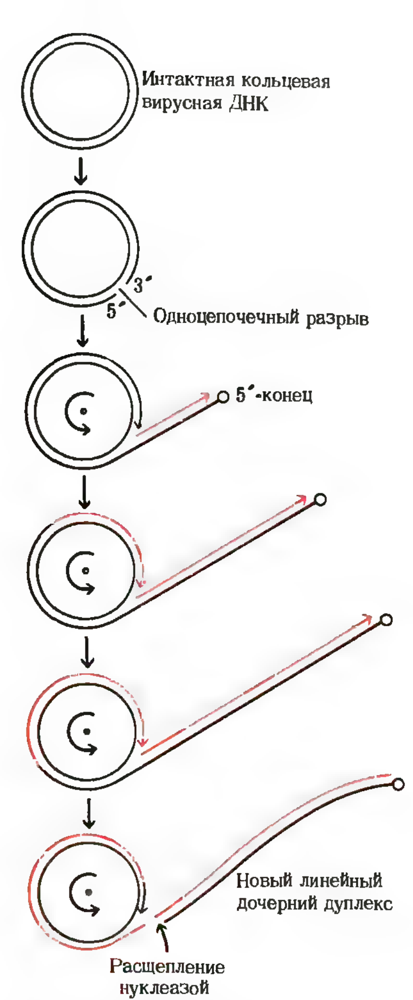


Рис. 28-5. Репликация по механизму «катящегося кольца», характерная для ряда вирусных ДНК. В одной из цепей происходит разрыв, после чего к 3'-концу этой цепи начинают присоединяться нуклеотиды. В результате разорванная родительская цепь удлиняется комплементарно другой родительской цепи, вытесняя свой собственный 5'-конец. Затем по мере того, как вытесненная цепь сматывается с кольца, начинается ее репликация. После завершения синтеза новой дочерней цепи, комплементарной этой разматывающейся цепи, новообразованный линейный дуплекс отщепляется с помощью нуклеазы и появляется линейная вирусная ДНК. Другая новообразованная (дочерняя) цепь повторяет теперь процесс репликации: ее 3'-конец удлиняется, а 5'-конец сматывается и служит матрицей для синтеза новой дочерней цепи. Таким образом, на матрице, представляющей собой«катящееся кольцо», может быть получено много новых линейных дуплексов. Репликация по такому механизму встречается и у эукариот при синтезе тандемно повторяющихся генов рРНК. В этом случае новые гены не отщепляются, а остаются в составе одной непрерывной цепи. См. разд. 27.26 и 28.25.

го роста эмбриона на ранних стадиях развития.

28.5. Бактериальные экстракты содержат ДНК-полимеразу

Теперь, когда мы получили общее представление о репликации ДНК, рассмотрим вопрос об участии ферментов в этом процессе. Впервые механизмы действия ферментов при репликации стали доступны прямому биохимическому исследованию благодаря важным работам Артура Корнберга и его коллег, начатым в 1956 г. Они инкубировали экстракты из клеток *E. coli* со смесью dATP, dTTP, dGTP и dCTP, α-фосфатная группа которых была помечена изотопом ^{32}P (рис. 28-6). Было обнаружено,

Рис. 28-6. Дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат, меченный [^{32}P] в α-положении.

что при этом синтезируется очень небольшое количество новой ДНК, содержащей в своих фосфатных группах изотоп ^{32}P. Фермент, катализирующий эту реакцию и названный ДНК-полимеразой I, был в конце концов очищен и его свойства были подробно изучены. Оказалось, что он катализирует последовательное присоединение дезоксирибонуклеотидных остатков к концу цепи ДНК с одновременным высвобождением неорганического пирофосфата, содержащего β- и γ-фосфатные группы каждого встраивающегося дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата. Уравнение реакции в простейшей форме имеет вид

$$\underset{\text{ДНК}}{(\text{dNMP})_n} + \text{dNTP} \rightleftarrows \underset{\text{Удлиненная ДНК}}{(\text{dNMP})_{n+1}} + \text{PP}_i$$

где dNMP и dNTP означают соответственно дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфат и дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат. Если хотя бы один из четырех предшественников отсутствует, то новая ДНК не образуется, т.е. синтез новой ДНК идет только в присутствии всех четырех предшественников. 5'-трифосфаты всех четырех дезоксирибонуклеозидов не могут быть заменены соответствующими 5'-дифосфатами или 5'-монофосфатами; фермент не работает также с рибонуклеозид-5'-трифосфатами. Для работы ДНК-полимеразе необходимы ионы Mg^{2+}, а в ее активном центре содержится прочно связанный с ферментом ион Zn^{2+}.

ДНК-полимераза катализирует ковалентное связывание новых дезоксирибонуклеотидов, которое происходит благодаря присоединению их α-фосфатных групп к свободному 3'-гидроксильному концу предсуществующей цепи ДНК; следовательно, синтез цепи ДНК происходит в направлении 5' → 3' (рис. 28-7). Энергия, затрачиваемая на образование каждой новой фосфодиэфирной связи в остове ДНК, обеспечивается расщеплением пирофосфатной связи между α- и β-фосфатными группами предшественников – дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. Образующийся при этом пирофосфат разрушается затем до фосфата, который может сдвигать реакцию в сторону ее завершения. В процессе работы было сделано очень важное наблюдение: было отмечено, что ДНК-полимеразная реакция протекает только в том случае, если в системе уже находится некоторое количество предсуществующей двухцепочечной ДНК.

28.6. Для действия ДНК-полимеразы необходима предсуществующая ДНК

Корнберг и его коллеги, изучая вопрос о том, зачем ДНК-полимеразе необходимо присутствие ДНК, нашли, что эта ДНК выполняет в полимеразной реакции две важнейшие функции – она служит *затравкой и матрицей.*

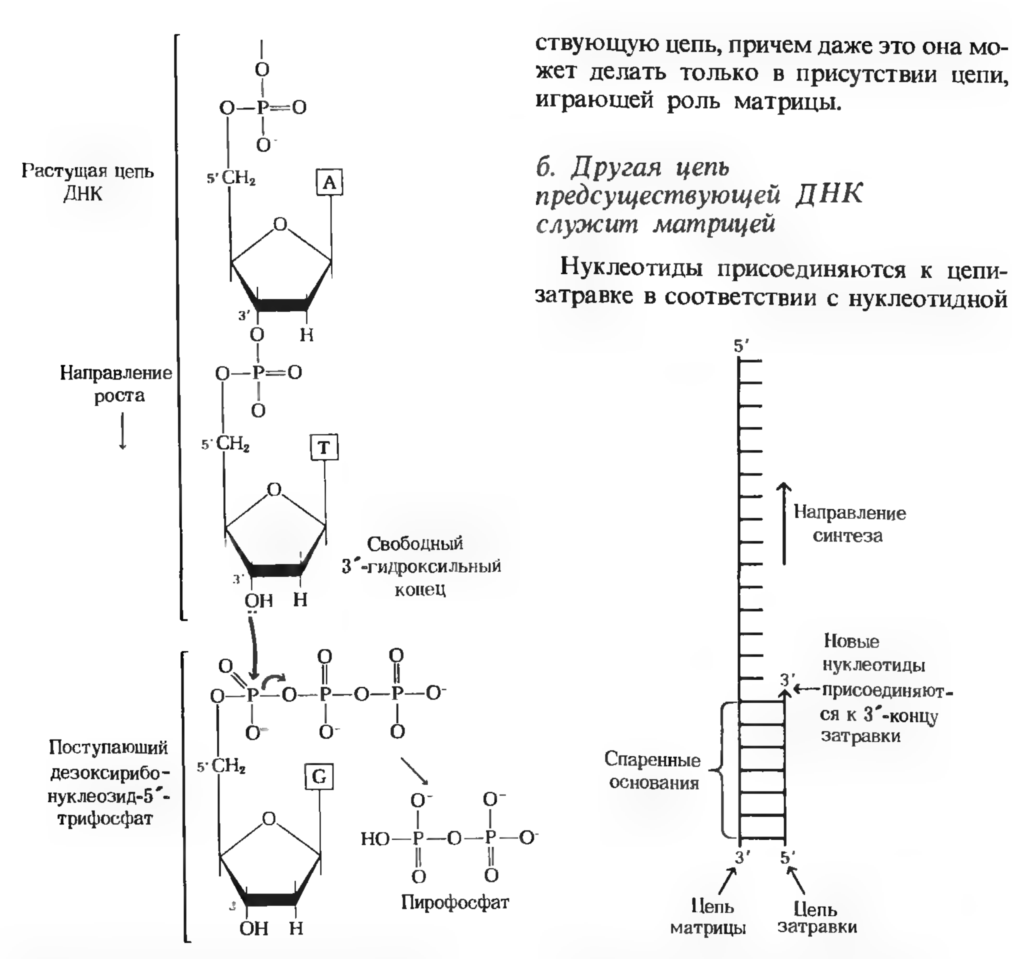


Рис. 28-7. Удлинение цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Новая межнуклеотидная связь образуется в результате нуклеофильной атаки свободной 3′-гидроксильной группой атома фосфора, находящегося в α-положении присоединяющегося дезоксирибонуклеозидтрифосфата. В ходе реакции высвобождается пирофосфат. Полинуклеотидная цепь ДНК-матрицы на рисунке не показана.

а. Одна из цепей предсуществующей ДНК служит затравкой

ДНК-полимераза последовательно добавляет нуклеотиды к 3′-концу одной из цепей, служащей затравкой. Следовательно, синтез новой цепи ДНК происходит в направлении 5′→3′. ДНК-полимераза не в состоянии сама по себе без затравки начать синтез новой ДНК; она способна только удлинять уже существующую цепь, причем даже это она может делать только в присутствии цепи, играющей роль матрицы.

б. Другая цепь предсуществующей ДНК служит матрицей

Нуклеотиды присоединяются к цепи-затравке в соответствии с нуклеотидной последовательностью цепи-матрицы по принципу комплементарного спаривания Уотсона–Крика. Где бы ни находился в матричной цепи остаток тимина, в дочерней цепи в этом месте встраивается остаток аденина, и наоборот. Аналогичным образом, если в цепи-матрице стоит остаток гуанина, то напротив него в дочерней цепи будет встроен остаток цитозина, и наоборот. Таким образом, продукт ДНК-полимеразной реакции – это дуплекс с комплементарно спаренными основаниями. На рис. 28-8 схематиче-

Рис. 28-8. Структура предсуществующей двухцепочечной ДНК, которая требуется для действия ДНК-полимеразы. Для того чтобы шел синтез, нужна одиночная неспаренная цепь, которая служит матрицей. Кроме того, необходимо присутствие цепи-затравки, к которой присоединяются новые нуклеотидные звенья.

ски показано, какую роль играет в ДНК-полимеразной реакции предсуществующая ДНК.

Поскольку ДНК-полимеразе необходимы как цепь-затравка, так и свободная цепь-матрица, этот фермент не способен осуществлять репликацию целой нативной хромосомы, если последняя является двухцепочечным кольцом, одноцепочечным кольцом или интактным линейным дуплексом, в котором спарены все основания. В связи с обязательным требованием для работы ДНК-полимеразы затравки и матрицы возникло много принципиальных вопросов относительно инициации и элонгации синтеза цепей ДНК.

28.7. Для репликации ДНК требуется много ферментов и белковых факторов

Ранние исследования Корнберга и его коллег открыли путь к прямому изучению репликации ДНК, однако и по сей день у нас нет полной и детальной картины процесса репликации, даже в случае вирусной ДНК, образующей всего лишь одну небольшую хромосому. Сегодня благодаря усилиям Корнберга и многих других исследователей мы знаем, что для репликации необходима не только ДНК-полимераза. В этом процессе, по-видимому, участвуют больше двадцати различных ферментов и белков, каждый из которых выполняет определенную функцию. Репликация состоит из большого числа последовательных этапов, которые включают узнавание точки начала репликации, расплетание родительского дуплекса, удержание его цепей на достаточном расстоянии друг от друга, инициацию синтеза новых дочерних цепей, их элонгацию, закручивание цепей в спираль и, наконец, терминацию репликации. Все эти этапы процесса репликации протекают с очень высокой скоростью и исключительной точностью. Весь комплекс, состоящий более чем из двадцати репликативных ферментов и факторов, называют *ДНК-репликазной системой*, или *реплисомой*. Рассмотрим в общих чертах основные этапы процесса репликации в том виде, в каком они известны нам на сегодняшний день.

28.8. В клетках *E. coli* присутствует три ДНК-полимеразы

Клетки *E. coli* содержат три различных ДНК-полимеразы, обозначаемые I, II и III (табл. 28-1). Наиболее широко распространенная из них – это ДНК-полимераза I, тот фермент, который был описан выше. Хотя Корнберг показал, что этот фермент способен реплицировать в пробирке целую молекулу ДНК мелкого вируса φX174 с образованием биологически активной дочерней ДНК, мы знаем, что ДНК-полимераза I – это не главный фермент, осуществляющий элонгацию ДНК в клетке. ДНК-полимераза I действительно принимает участие в репликации, но, как мы увидим позже, особым образом.

В интактных клетках *E. coli* за элонгацию цепи ДНК отвечает главным образом ДНК-полимераза III. Она функцио-

Таблица 28-1. ДНК-полимеразы *E. coli*[1)]

	I	II	III
Катализируемая активность			
5′ → 3′-полимеразная	+	+	+
5′ → 3′-экзонуклеазная	+	–	+
3′ → 5′-экзонуклеазная	+	+	+
Молекулярная масса	109 000	120 000	400 000
Число молекул фермента в расчете на клетку	400		10
Активность (число присоединяемых нуклеотидов за минуту в расчете на одну молекулу при 37°С)	600	30	9 000

[1)] Из книги: A. Kornberg, DNA Replication, Freeman, San Francisco, 1980, p. 168.

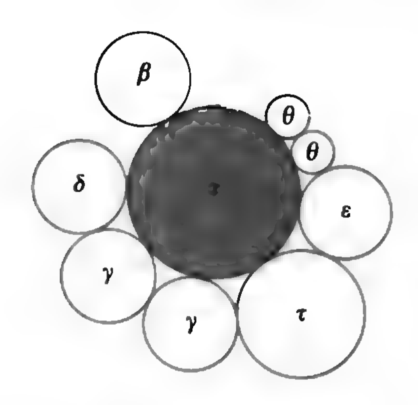


Рис. 28-9. Холофермент ДНК-полимеразы III. Он состоит из собственно полимеразы (субъединица α) и ряда других субъединиц.

нирует в форме большого комплекса с мол. массой ~550000, называемого холоферментом ДНК-полимеразы III (рис. 28-9). Этот комплекс содержит в своем составе ион Zn^{2+} и требует для работы наличия ионов Mg^{2+}. Ему также необходимы матрица и затравка, без которых он не может инициировать процесс репликации. Подобно ДНК-полимеразе I, он удлиняет ДНК в направлении 5'→3', присоединяя новые нуклеотиды к 3'-концу цепи-затравки. Холофермент состоит из нескольких субъединиц. Субъединица β, или кополимераза III, необходима для узнавания и связывания цепи-затравки, роль которой выполняет родительская ДНК. Как только холофермент присоединяется к правильному месту инициации, кополимераза III высвобождается из комплекса. Элонгацию цепи дочерней ДНК осуществляет оставшийся комплекс ДНК-полимеразы III. Оба фермента – ДНК-полимераза I и ДНК-полимераза III – обладают тремя ферментативными активностями. Кроме полимеразной активности они имеют 5'→3'- и 3'→5'-экзонуклеазные активности, т. е. они могут отщеплять концевые нуклеотиды с любого конца цепи ДНК. Позже мы увидим, в чем смысл экзонуклеазных активностей ДНК-полимераз. Функция ДНК-полимеразы II пока неизвестна.

Теперь рассмотрим некоторые проблемы, которые возникают при формировании наших представлений о репликации ДНК.

28.9. Одновременная репликация обеих цепей ДНК создает проблемы

Одна из проблем связана с тем, что ДНК-полимеразы способны присоединять новые мономеры только к 3'-концу ДНК. Мы уже видели, что при репликации хромосомы *E. coli* обе цепи в месте нахождения репликативной вилки реплицируются одновременно. В то же время мы знаем, что в двухцепочечной ДНК цепи антипараллельны. Это означает, что рост дочерних цепей также должен происходить антипараллельно. В репликативной вилке находятся 3'-конец одной растущей цепи и 5'-конец другой. Из того что ДНК-полимераза может присоединять нуклеотиды только к 3'-концу и не может присоединять их к 5'-концу, следует, что ДНК-полимераза способна удлинять только одну из двух растущих цепей в направлении движения репликативной вилки. Тогда возникают вопросы. Быть может, существуют два класса ДНК-полимераз, и представители одного из них присоединяют остатки только к 3'-концу, а другого – только к 5'-концу? Или же существует такая ДНК-полимераза, которая может удлинять цепь как с 5'-, так и с 3'-конца? Или же, наконец, одна из цепей реплицируется ферментами, движущимися в направлении, противоположном направлению движения репликативной вилки?

28.10. Открытие фрагментов Оказаки

Ответ на все эти вопросы дало важное наблюдение, сделанное Рейджи Оказаки из Японии, который обнаружил, что в ходе репликации ДНК *E. coli* и других бактерий бóльшая часть новообразованной ДНК обнаруживается в форме небольших кусков. Эти куски, получившие название *фрагментов Оказаки*, содержат приблизительно 1000–2000 нуклеотидных остатков. Оказаки предположил, что эти фрагменты представляют собой короткие отрезки молекулы ДНК, образующиеся в результате прерывистой репликации и затем соединяющиеся друг

с другом в одну цепь. Благодаря этому открытию удалось показать, что одна из цепей ДНК реплицируется *непрерывно* в направлении 5′ → 3′, т.е. в направлении движения репликативной вилки; эту цепь называют *ведущей*. Другая же цепь синтезируется *прерывисто* с образованием коротких фрагментов, также за счет присоединения новых мономеров к 3′-концу, т.е. в направлении, противоположном движению репликативной вилки. Затем фрагменты Оказаки с помощью ферментов сшиваются друг с другом, образуя вторую дочернюю цепь, называемую *отстающей* (рис. 28-10). Как позже было показано, фрагменты Оказаки образуются не только в бактериальных, но и в животных клетках, правда в последних они гораздо короче – их длина не превышает двухсот нуклеотидных остатков.

28.11. Для синтеза фрагментов Оказаки необходима РНК-затравка

После открытия фрагментов Оказаки проблема репликации ДНК осложнилась в еще большей степени. Поскольку ДНК-полимераза не способна инициировать новую цепь, оставалось непонятным, каким образом инициируется каждый из фрагментов Оказаки? Неожиданно обнаружилось, что для образования фрагментов Оказаки в клеточных экстрактах необходимо присутствие не только dATP, dGTP, dCTP и dTTP, но также и смеси рибонуклеозид-5′-трифосфатов (ATP, GTP, CTP и UTP). Это и другие наблюдения навели на мысль, что для синтеза ДНК каким-то образом необходим синтез РНК.

В конце концов оказалось, что так оно и есть. Для синтеза фрагментов Оказаки в качестве затравок требуются, как выяснилось, короткие отрезки РНК, комплементарные матричной цепи ДНК. Эта РНК образуется в направлении 5′ → 3′ из ATP, GTP, CTP и UTP с помощью фермента, называемого *примазой*. К 3′-концу этой короткой одноцепочечной РНК-затравки и присоединяются друг за другом дезоксирибонуклеотидные остатки, комплементарные цепи-матрице ДНК. Обычно РНК-затравка состоит всего лишь из нескольких рибонуклеотидных остатков (рис. 28-11), к которым затем ДНК-полимераза III присоединяет 1000–2000 дезоксирибонуклеотидных остатков, и в результате образуется фрагмент Оказаки. Естественно, нуклеотидная последовательность новосинтезированного фрагмента Оказаки комплементарна нуклеотидной последовательности соответствующего участка цепи-матрицы. После завершения синтеза фрагмента Оказаки РНК-затравка удаляется,

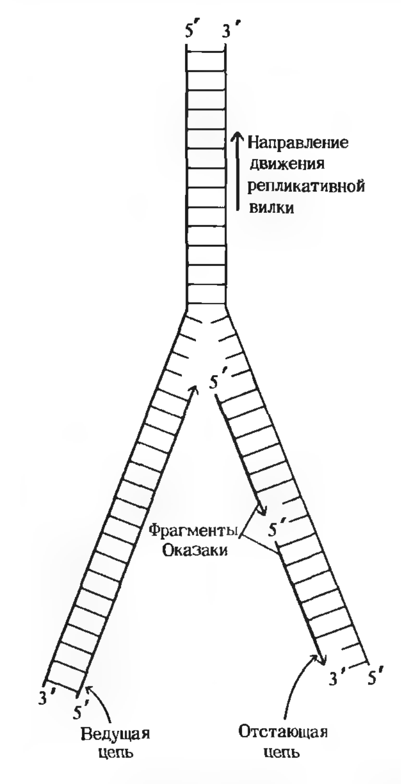


Рис. 28-10. Прерывистая репликация одной из цепей ДНК в виде коротких фрагментов. Цепь, которая реплицируется непрерывно (в направлении движения репликативной вилки), называется ведущей. Другая цепь реплицируется с перерывами, в виде коротких фрагментов (фрагменты Оказаки); направление ее репликации противоположно направлению движения репликативной вилки. Фрагменты Оказаки соединяются затем друг с другом с помощью ДНК-лигазы, образуя отстающую цепь. У прокариот фрагменты Оказаки достигают длины 1000–2000 нуклеотидов. В животных клетках они содержат 150–200 нуклеотидов.



Рис. 28-11. Участие короткого фрагмента комплементарной РНК в качестве затравки при синтезе фрагментов Оказаки. Синтез этой РНК катализируется примазой, для действия которой затравка не требуется.

нуклеотид за нуклеотидом, с помощью 5′→3′-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I. По мере отщепления рибонуклеотидных мономеров каждый из них замещается на соответствующий дезоксирибонуклеотид в ходе полимеразной реакции, осуществляемой ДНК-полимеразой I; при этом в качестве затравки используется 3′-конец предыдущего фрагмента Оказаки. Однако ДНК-полимераза I не может совершить последнее ковалентное присоединение фрагмента Оказаки к растущей цепи ДНК; для этого требуется другой фермент.

28.12. Фрагменты Оказаки соединяются друг с другом при помощи ДНК-лигазы

Новый фрагмент Оказаки присоединяется к отстающей цепи ДНК с помощью фермента ДНК-лигазы, который катализирует образование фосфодиэфирной связи между 3′-гидроксильной группой на конце ДНК, подлежащей удлинению, и 5′-фосфатной группой новосинтезированного фрагмента Оказаки. Образование этой связи требует затраты энергии, которая поставляется в ходе сопряженного гидролиза пирофосфатной связи NAD^+ (в бактериальных клетках) или ATP (в животных клетках) (рис. 28-12). ДНК-лигазная реакция, ме-

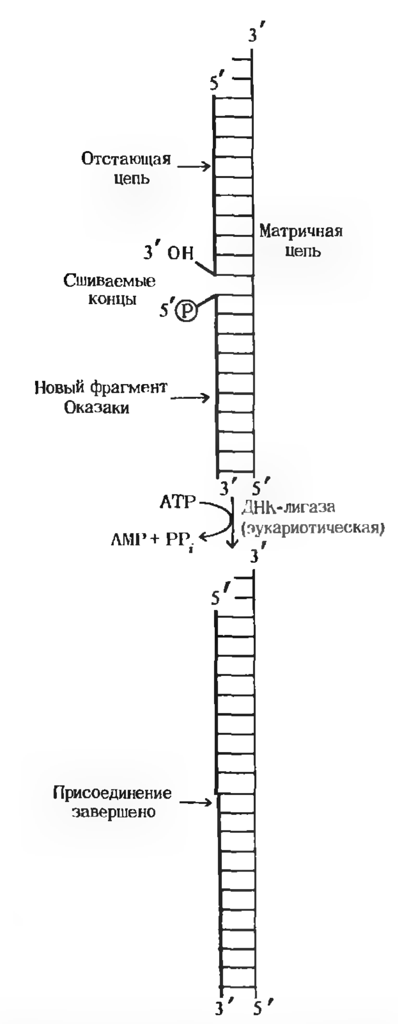


Рис. 28-12. Присоединение фрагмента Оказаки к отстающей цепи, катализируемое ДНК-лигазой. Два нуклеотида, которые надлежит соединить, должны быть комплементарны матричной цепи. На самом деле реакция протекает в несколько этапов.

ханизм которой довольно сложен, протекает наиболее эффективно в тех случаях, когда два фрагмента, которые следует соединить друг с другом, полностью комплементарны матричной цепи ДНК.

Как мы увидим ниже (гл. 30), ДНК-лигаза выполняет и другие функции, связанные с соединением фрагментов.

28.13. Для репликации необходимо физическое разделение цепей родительской двухцепочечной ДНК

Мы уже видели, что кольцевая двухцепочечная ДНК реплицируется одновременно в обоих направлениях, так что две репликативные вилки перемещаются вдоль кольцевой хромосомы навстречу друг другу. Если мы теперь вспомним, что двойная спираль ДНК представляет собой плотно скрученную структуру и что кодирующие основания находятся внутри спирали, то станет ясно: чтобы реплицирующие ДНК ферменты смогли «прочитать» нуклеотидную последовательность матрицы, цепи родительской ДНК должны быть разделены хотя бы на коротком участке. Даже если бактериальная ДНК отрицательно сверхспирализована, т. е. уже слегка раскручена, по мере движения репликативной вилки вперед она должна дополнительно расплетаться.

Раскручивание двойной спирали и удержание двух цепей на некотором расстоянии друг от друга, чтобы они могли реплицироваться, осуществляется при помощи нескольких специальных белков (рис. 28-13). Ферменты, известные под названием *хеликаз* (helicase, от слова helix – спираль), расплетают короткие участки ДНК, находящиеся непосредственно перед репликативной вилкой. Для раскручивания ДНК требуется энергия. На разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза двух молекул ATP до ADP и фосфата. Как только небольшой участок ДНК оказывается расплетенным, к каждой из разделившихся цепей прочно присоединяются несколько молекул *ДНК-связывающего белка* (ДСБ), которые препятствуют

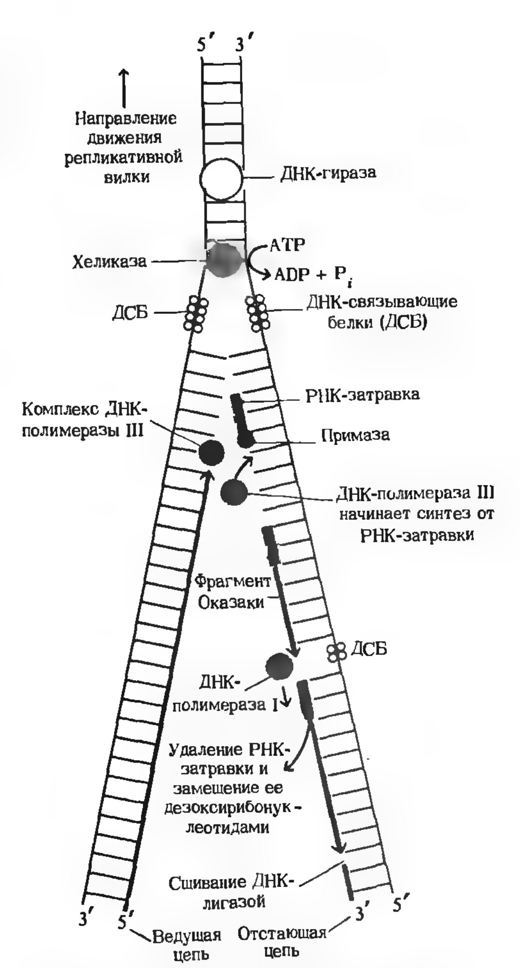


Рис. 28-13. Схематическое изображение основных этапов репликации ДНК. Существует некоторая неопределенность относительно точного места действия ДНК-гиразы.

образованию комплементарных пар и обратному воссоединению цепей. Благодаря этому нуклеотидные последовательности цепей ДНК оказываются доступными для репликативной системы. ДНК-полимераза может непосредственно удлинять ведущую цепь, добавляя к ее 3′-концу новые нуклеотиды. Другие специфические белки помогают примазе получить доступ к матрице для отстающей цепи. В результате примаза получает возможность связываться с отстающей цепью и синтезировать РНК-затравки для фрагментов Оказаки. Расплетание ДНК – одна из наиболее интересных и

в то же время наиболее сложных проблем репликации ДНК. Предстоит еще много сделать, прежде чем мы поймем, как живая клетка решает эту механическую и биохимическую проблему. На рис. 28-13 указаны основные белки, необходимые для репликации ДНК.

Быстрое раскручивание цепей родительской ДНК в процессе репликации (4500 об/мин) порождает еще одну проблему, которая состоит в том, что при отсутствии специального шарнирного устройства вся хромосома, расположенная впереди репликативной вилки, должна вращаться с такой же скоростью. Предполагают, что избежать этого помогает клетке шарнир в ДНК (возможно, прямо перед репликативной вилкой), благодаря которому вращаться с большой скоростью приходится только короткому участку ДНК. Это может быть достигнуто за счет кратковременного разрыва одной из цепей ДНК, который очень быстро и точно восстанавливается после одного или нескольких оборотов. Кратковременные разрывы и воссоединения осуществляются ферментами, известными под названием топоизомераз. У прокариот топоизомераза называется *ДНК-гиразой* (от англ. gyration – вращение). Этот фермент не только позволяет ДНК вращаться, но и активно закручивает ее в направлении, благоприятствующем расплетанию цепей матрицы в районе репликативной вилки. Таким образом, гираза помогает хеликазе раскручивать ДНК для ее репликации. Закручивание ДНК с помощью гиразы и сопряженный с этим процессом гидролиз АТР до ADP и P_i, обусловливают сверхспиральное состояние хромосомы. Благодаря гиразе все кольцевые ДНК бактериальных клеток поддерживаются в сверхспиральной форме (рис. 28-14).

По мере того как репликативная система ликвидирует разрывы в отстающей цепи, она движется вдоль реплицирующейся ДНК. Две новые цепи соединяются со своими комплементарными цепями-матрицами автоматически, образуя две дочерние двойные спирали, каждая из которых содержит одну родительскую и одну новосинтезированную цепь. Для образования новых спиралей не требуется ни затрат энергии, ни участия какого-либо «закручивающего» фермента.

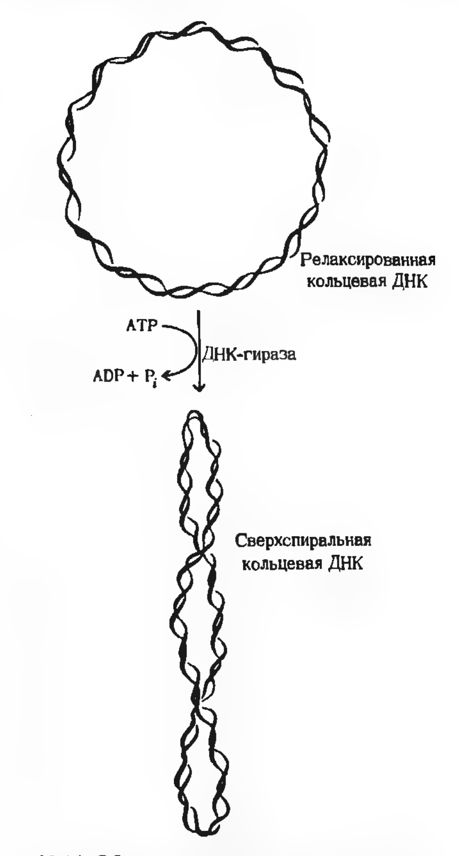


Рис. 28-14. Образование отрицательных сверхвитков под действием ДНК-гиразы. Необходимая для этого процесса энергия освобождается в результате гидролиза АТР. ДНК-гираза делает в одной из цепей ДНК разрыв. Через открывшуюся брешь выходит интактная цепь, после чего концы разорванной цепи сшиваются тем же ферментом.

28.14. ДНК-полимеразы могут находить и исправлять ошибки

Было установлено, что частота ошибок при репликации ДНК *E. coli* не превышает 1 на 10^9–10^{10} нуклеотидов. Поскольку хромосома *E. coli* содержит приблизительно $4{,}5 \cdot 10^6$ пар оснований, на 10 000 клеток, претерпевших один цикл деления, встраивается всего один неправильный нуклеотид. Долгое время считалось, что столь высокая степень точности

воспроизведения генетической информации целиком определяется точностью уотсон-криковского спаривания между матричной и новообразованной (дочерней) цепями, однако в результате последующего анализа выяснилось, что если бы точность репликации зависела исключительно от правильности спаривания оснований, то частота ошибок была бы значительно выше – приблизительно 1 на 10^4–10^5 остатков. Следовательно, чтобы объяснить такую низкую частоту ошибок при репликации in vivo, необходимо предположить участие в процессе репликации еще какого-то одного или нескольких факторов.

Более детальное изучение свойств высокоочищенных ДНК-полимераз позволило получить по крайней мере частичный ответ на вопрос о природе этих факторов. Напомним, что ДНК-полимеразы I и III обладают тремя различными ферментативными активностями. Мы уже видели, как фермент функционирует в качестве полимеразы, а также как он может удалять нуклеотидные остатки с 5′-конца фрагмента ДНК. Однако 3′-экзонуклеазная активность ДНК-полимераз I и III очень озадачивала исследователей, ибо она означала, что эти ферменты способны «пятиться», отщепляя 3′-концевые нуклеотиды в направлении, противоположном тому, в котором они действуют как полимеразы. 3′-экзонуклеазная активность ДНК-полимераз I и III – это средство проверки новосинтезированной цепи ДНК и исправления ошибок, сделанных ферментом при его работе в качестве полимеразы. Если ДНК-полимераза встраивает неправильный нуклеотид, то фермент сам может распознать неспособность этого нуклеотида образовать правильную пару с соответствующим нуклеотидом матрицы (рис. 28-15). В этом случае фермент возвращается назад и отщепляет неправильный нуклеотид с 3′-конца цепи, после чего полимераза продолжает присоединять правильные нуклеотиды, т.е. возобновляет свое обычное продвижение в направлении 5′ → 3′. Таким образом, по мере перемещения репликативной вилки вдоль матрицы осуществляется проверка каждого встроенного нуклеотида. Корректирующее действие ДНК-полимеразы очень эффективно; благодаря ему точность репликации повышается как минимум в 10^4 раз. Суммарная ошибка возникает в результате ошибок, допускаемых ферментом в ходе полимеризации и в процессе исправления их при корректировке; она не превышает одной ошибки на 10^9–10^{10} нуклеотидных остатков.

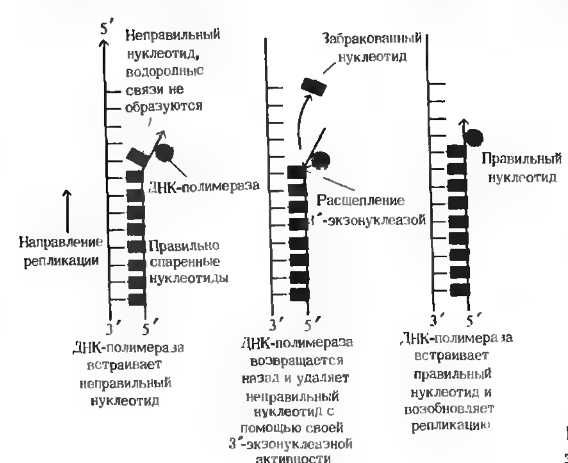


Рис. 28-15. Исправление ошибок с помощью 3′-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы.

Очень важно отметить, что процесс репликации протекает со значительно более высокой степенью точности, чем процессы транскрипции и трансляции. Частые ошибки в репликации подвергли бы большому риску сохранность видов

и их жизнеспособность. Ошибки же в транскрипции и трансляции гораздо менее опасны, поскольку они влияют на образование РНК или белка только в одной клетке и не изменяют всю последующую родословную вида. Корректировка с помощью ДНК-полимеразы – это, вероятно, лишь один из путей, обеспечивающих высокую точность репликации. Возможно, исключительно сложная организация репликативного процесса и участие в нем множества белков необходимы для достижения именно этой цели. Интересно, что некоторые эукариотические ДНК-полимеразы не осуществляют корректировку. По-видимому, эукариоты обеспечивают точность и надежность процесса репликации с помощью каких-то других средств.

28.15. Репликация в эукариотических клетках протекает особенно сложно

Процесс репликации эукариотической ДНК несомненно должен протекать гораздо сложнее, чем репликация ДНК *E. coli*, поскольку в эукариотических клетках одновременно реплицируется большое число хромосом, размер которых существенно превышает размер прокариотической хромосомы. К тому же, в силу того, что короткие участки эукариотической ДНК обвиты вокруг белковых частиц, образуя нуклеосомы, которые в свою очередь плотно уложены в спиральную структуру (разд. 27.20), репликация этой ДНК помимо раскручивания ДНК, обеспечивающего доступность оснований, должна сопровождаться еще механическими и геометрическими изменениями структуры ДНК.

Хотя мы пока еще очень мало знаем о конкретных этапах и ферментативных факторах, необходимых для осуществления этих предварительных процессов в эукариотических клетках, ряд данных свидетельствует о том, что основные ферментативные процессы собственно репликации эукариотической ДНК, коль скоро эта ДНК «раскрыта» и доступна полимеразам, имеют много общего с аналогичными процессами у прокариот. Эукариотические ядра содержат ДНК-полимеразы, ДНК-лигазу и разнообразные расплетающие ферменты и белки. Эукариотическая ДНК также реплицируется посредством фрагментов Оказаки, которые гораздо короче, чем в бактериях, но инициируются также с помощью РНК-затравок. Расчеты показали, что в клетках млекопитающих скорость движения репликативных вилок составляет лишь около 60 оснований в секунду, или менее 1 мкм/мин. Однако, как мы уже упоминали (рис. 28-4), в эукариотических хромосомах одновременно работают тысячи или даже большее число репликативных вилок.

28.16. Гены транскрибируются с образованием РНК

Обратимся теперь к следующему основному этапу в передаче генетической информации, а именно к *транскрипции* содержащейся в ДНК генетической информации в форму РНК. В этом процессе с помощью ферментной системы происходит синтез цепи РНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна последовательности одной из цепей ДНК. Транскрипция должна осуществляться точно, поскольку клетке нужны белки с нормальной генетически детерминированной последовательностью аминокислот. В результате транскрипции образуются три класса РНК. Во-первых, это *матричная РНК (мРНК)*, которая поступает в рибосомы и там направляет синтез одного или нескольких полипептидов, аминокислотная последовательность которых была закодирована геном или группой генов в хромосоме. Около 90–95% хромосомы *E. coli* кодирует матричные РНК. Остальная часть хромосомы кодирует транспортные и рибосомные РНК, а также включает регуляторные последовательности, лидеры, спейсеры и хвостовые последовательности.

Между процессами репликации и транскрипции существует важное различие. В процессе репликации копируется вся хромосома и образуются дочерние ДНК, идентичные родительской ДНК. При

транскрипции же не обязательно должна транскрибироваться вся клеточная ДНК. Напротив, обычно транскрибируются лишь отдельные гены или группы генов. Таким образом, процесс транскрипции ДНК протекает избирательно, он должен направляться особыми регуляторными последовательностями, указывающими начало и конец участков ДНК, подлежащих транскрипции.

28.17. Матричные РНК кодируют полипептидные цепи

Мысль о том, что какой-то вид РНК несет генетическую информацию для биосинтеза белка, была первоначально высказана на основании того, что у эукариот почти вся ДНК сосредоточена в ядре, в то время как синтез белка протекает главным образом в цитоплазме на рибосомах. Следовательно, какая-то макромолекула, отличная от ДНК, должна переносить генетическую информацию от ядра к рибосомам. Логическим кандидатом на эту роль была РНК, поскольку ее обнаружили и в ядре, и в цитоплазме. Было также отмечено, что начало синтеза белка в клетке сопровождается увеличением содержания РНК в цитоплазме и увеличением скорости ее обновления. Эти и другие наблюдения привели Френсиса Крика к предположению (ставшему частью центральной догмы молекулярной генетики), что РНК выполняет функцию переноса генетической информации от ДНК к рибосомам, где происходит биосинтез белка. Позже, в 1961 г., Франсуа Жакоб и Жак Моно предложили название *матричная РНК* для той части клеточной РНК, которая переносит генетическую информацию от ДНК к рибосомам, т. е. к месту, где эти молекулы-переносчики служат матрицами для биосинтеза полипептидных цепей с определенной последовательностью аминокислот.

В любой данный момент в растущих клетках *E. coli* присутствует чрезвычайно сложная смесь сотен мРНК, каждая из которых кодирует одну или несколько полипептидных цепей. Долгое время было фактически невозможно выделить из этой сложной смеси один-единственный тип молекул мРНК, однако сегодня благодаря появлению значительно более совершенных методов мы довольно полно представляем себе структуру мРНК.

Матричные РНК – это одноцепочечные молекулы самой разной длины. У прокариот одна молекула мРНК может кодировать одну, две и даже большее число полипептидных цепей. Если она несет информацию только об одном полипептиде, то такая мРНК называется *моногенной*, или *моноцистронной*; если же она кодирует два или большее число разных полипептидов, то такую мРНК называют *полигенной*, или *полицистронной*. Минимальная длина мРНК определяется длиной полипептидной цепи, которую она кодирует. Например, для синтеза полипептидной цепи, содержащей 100 аминокислотных остатков, требуется мРНК с кодирующей последовательностью не менее 300 нуклеотидов, поскольку каждая аминокислота кодируется тройкой нуклеотидов (триплетом) (разд. 27.23).

Однако сегодня мы знаем, что образующиеся при бактериальной транскрипции мРНК всегда несколько длиннее, чем это необходимо для полипептида или полипептидов, которые они кодируют. Это объясняется тем, что мРНК содержат на 5'-конце некодирующий полинуклеотидный «лидер». Длина этих лидеров может составлять от 25 до 150 оснований. Полигенные мРНК могут также содержать нетранслируемые *межгенные области*, или *спейсеры*, которые разделяют участки, кодирующие отдельные полипептидные цепи, и, видимо, помогают регулировать скорость трансляции. Полигенные мРНК кодируют обычно две или большее число разных полипептидных цепей, функционирующих вместе, – например, два или большее число ферментов, принимающих участие в одной и той же цепи метаболических реакций, например в биосинтезе какой-нибудь аминокислоты. На рис. 28-16 в общем виде представлена структура прокариотических мРНК.

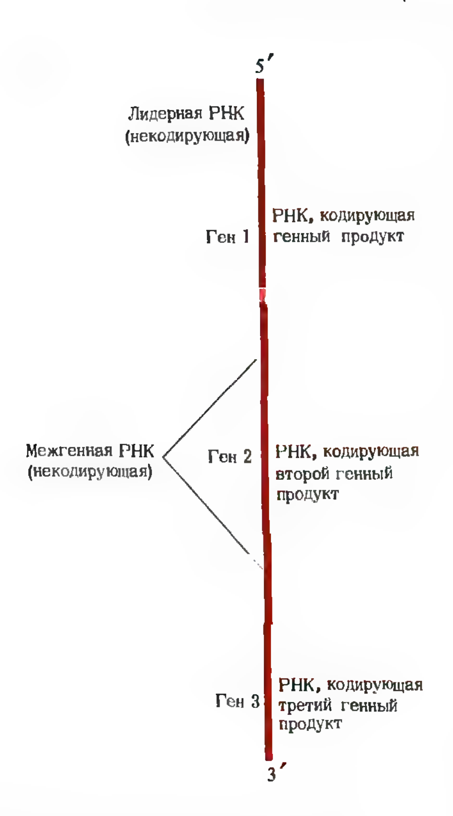


Рис. 28-16. Схематическое изображение полигенной мРНК из прокариотических клеток: в данном случае мРНК представляет собой транскрипт трех генов. Транскрипты генов разделены межгенными участками, или спейсерами.

28.18. Матричная РНК синтезируется при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы

Открытие ДНК-полимеразы и зависимости ее функционирования от присутствия ДНК-матрицы естественно привело к поиску ферментов, которые могли бы обеспечить синтез цепи РНК, комплементарной матрице ДНК. В 1959 г. такой фермент, способный образовывать полимер РНК из рибонуклеозид-5′-трифосфатов, был выделен из бактериальных экстрактов почти одновременно и независимо четырьмя разными группами американских биохимиков. Этот фермент, получивший название *ДНК-зависимой РНК-полимеразы*, по ряду свойств похож на ДНК-зависимую ДНК-полимеразу. РНК-полимеразе необходимы все четыре рибонуклеозид-5′-трифосфата (ATP, GTP, UTP и CTP) в качестве предшественников нуклеотидных элементов РНК, а также ионы Mg^{2+}. В качестве существенного компонента активного центра она содержит цинк. РНК-полимераза удлиняет цепь РНК, присоединяя рибонуклеотидные мономеры к 3′-гидроксильному концу молекулы РНК, т.е. строит цепи РНК в направлении 5′→3′. Из β- и γ-фосфатных групп предшественников нуклеозид-5′-трифосфатов образуется неорганический пирофосфат. Удлинение цепи РНК описывается уравнением

$$\underset{\text{РНК}}{(NMP)_n} + \underset{\text{Рибонуклеозид-5'-трифосфат}}{NTP} \rightleftarrows \underset{\text{Удлиненная РНК}}{(NMP)_{n+1}} + PP_i$$

РНК-полимераза требует для своего функционирования присутствия ДНК. Фермент наиболее активен, если в качестве матрицы используется природная двухцепочечная ДНК из того же самого или из какого-либо другого организма. Из двух цепей ДНК транскрибируется только одна. В места, соответствующие остаткам аденина ДНК-матрицы, в новосинтезированную РНК включаются остатки урацила (U), поскольку аденин и урацил образуют комплементарную пару. В места же, соответствующие тиминовым остаткам ДНК-матрицы, включаются остатки аденина. Остатки гуанина и цитозина в ДНК-матрице определяют включение соответственно цитозиновых и гуаниновых остатков в цепь РНК. Анализ нуклеотидного состава и нуклеотидной последовательности новообразованной РНК показал, что она обладает противоположной по отношению к матрице полярностью и её последовательность комплементарна последовательности матричной цепи. Хотя для работы РНК-полимеразы затравка не требуется, этот фермент не начинает функционировать до тех пор, пока не свяжется с особым участком матричной цепи ДНК, который служит сигналом ини-

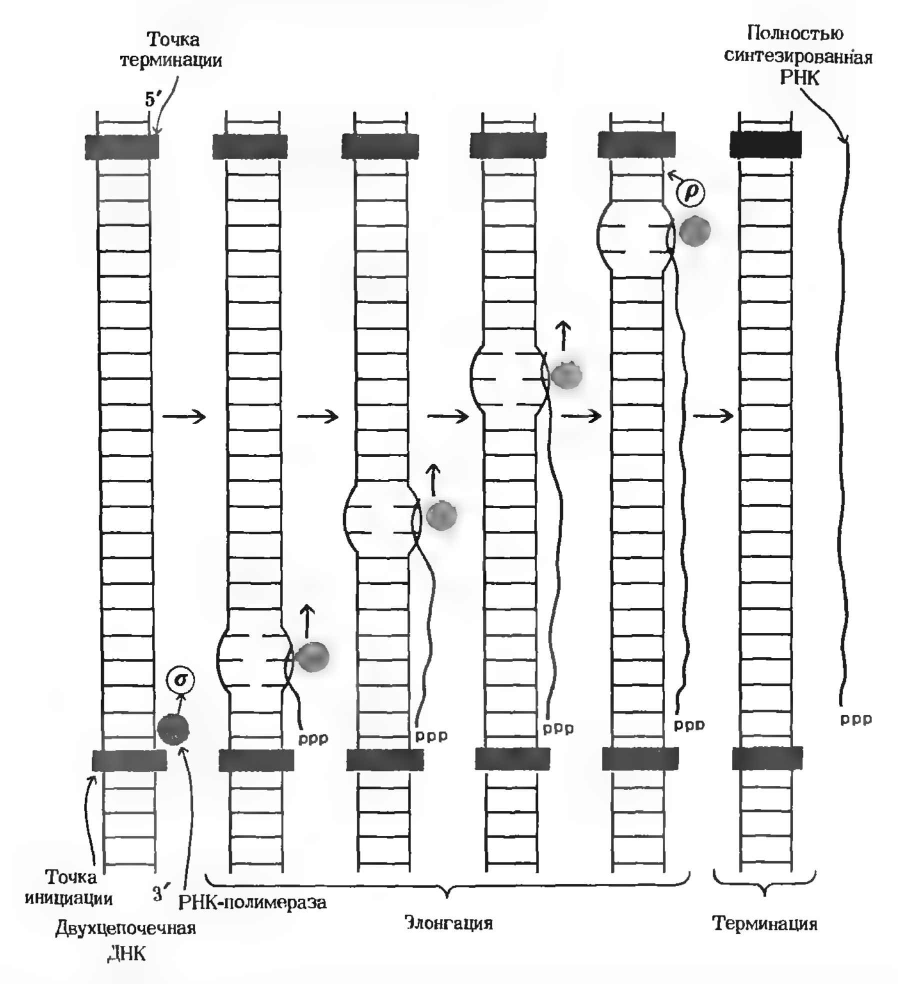


Рис. 28-17. Обобщенное изображение этапов транскрипции. РНК-полимераза прокариот должна сначала связаться с промоторным участком ДНК (гл. 29). Затем она движется к месту инициации синтеза РНК, где начинает транскрипцию со строго определенного нуклеотида, строя молекулу РНК в направлении 5' → 3'. Приведенная схема не отражает действительной длины гибрида РНК–ДНК, которая составляет приблизительно 10 нуклеотидных пар. После инициации транскрипции субъединица σ отделяется от фермента. Для терминации синтеза цепи РНК необходима субъединица ρ.

циации транскрипции. После связывания с этим участком фермент начинает синтез новой молекулы РНК; на ее 5'-конце обычно находится остаток GTP или АТР, чья 5'-трифосфатная группировка (обозначаемая ppp) не расщепляется до PP_i и остается без изменений на протяжении всего процесса транскрипции. В ходе транскрипции новосинтезируемая цепь РНК временно образует (за счет спаривания ее оснований с основаниями матричной цепи ДНК) короткие отрезки гибридной двойной спирали ДНК–РНК, которые необходимы для правильного считывания цепи ДНК. Гибридный дуплекс существует лишь непродолжительное время, поскольку вскоре после синтеза РНК «сходит» с ДНК (рис. 28-17).

В *E. coli* присутствует только одна ДНК-зависимая РНК-полимераза, которая способна синтезировать не только мРНК, но также тРНК и рРНК. Она представляет собой большой (мол. масса 500 000) и сложный фермент, состоящий из пяти полипептидных субъединиц: двух α-цепей, одной β-, одной β'- и одной σ-це-

пи. Структура холофермента этой полимеразы обозначается так: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Первый этап транскрипции – это присоединение холофермента к особому участку ДНК, называемому *промотором*, который представляет собой короткую последовательность, узнаваемую РНК-полимеразой. Разные промоторы несколько отличаются друг от друга по последовательности, что и определяет, вероятно, эффективность транскрипции разных генов. Как только РНК-полимераза заняла правильное положение в промоторном участке и образовала несколько фосфодиэфирных связей, субъединица σ отделяется от холофермента. Оставшийся «кор-фермент» (от англ. core – сердцевина) продолжает шаг за шагом удлинять молекулу РНК. Об окончании транскрибируемого гена (или генов) сигнализирует особая *терминирующая последовательность* в матрице ДНК. Для прекращения транскрипции и отделения РНК-полимеразы от ДНК необходим еще один специфический белок, обозначаемый ρ. Таким образом, синтез РНК включает три этапа: *инициацию*, *элонгацию* и *терминацию* (рис. 28-17).

Идентификации нуклеотидных последовательностей ДНК, в которых РНК-полимераза начинает и заканчивает транскрипцию, посвящены многочисленные исследования, однако пока еще многое относительно этих важных сигналов остается невыясненным.

28.19. Ядра эукариотических клеток содержат три РНК-полимеразы

В эукариотических клетках присутствуют три ядерные РНК-полимеразы – I, II и III (табл. 28-2). РНК-полимераза I находится в ядрышке и участвует главным образом в биосинтезе рРНК, в то время как РНК-полимеразы II и III обнаруживаются в хроматине и нуклеоплазме. РНК-полимераза II осуществляет синтез мРНК, а РНК-полимераза III отвечает за синтез тРНК и 5S-рРНК. Митохондрии, подобно бактериям, содержат только одну РНК-полимеразу. Удлинение цепи РНК с помощью эукариотических ДНК-зависимых РНК-полимераз происходит таким же образом, как и при участии фермента из *E. coli*; однако эти ферменты отличаются друг от друга по своей субъединичной структуре и по регуляторным элементам. Это естественно, поскольку эукариотические РНК-полимеразы должны транскрибировать ДНК, которая плотно упакована в нуклеосомы и связана с другими ядерными белками хроматина.

Таблица 28-2. Продукты, синтезируемые эукариотическими ДНК-зависимыми РНК-полимеразами

Фермент	Продукт
РНК-полимераза I	5,8S-, 18S- и 28S-рРНК
РНК-полимераза II	мРНК
РНК-полимераза III	тРНК; 5S-рРНК

28.20. ДНК-зависимую РНК-полимеразу можно избирательно ингибировать

Элонгация цепей РНК с помощью РНК-полимеразы специфически ингибируется антибиотиком актиномицином D как у прокариот, так и у эукариот (рис. 28-18). Плоская часть молекулы этого антибиотика интеркалирует в двойную спираль ДНК между соседними парами G–C, деформируя матрицу ДНК. Эта локальная деформация мешает движению полимеразы вдоль матрицы. Таким образом, актиномицин D вызывает как бы «заедание молнии». Поскольку актиномицин D ингибирует процесс элонгации РНК как в интактных клетках, так и в клеточных экстрактах, его использование оказалось очень удобным диагностическим средством для идентификации клеточных процессов, которые зависят от синтеза РНК. Другим интеркалирующим ингибитором является акридин, молекулы которого также имеют плоскую структуру.

Еще одним важным антибиотиком, ингибирующим синтез РНК, является рифампицин, который связывается с β-

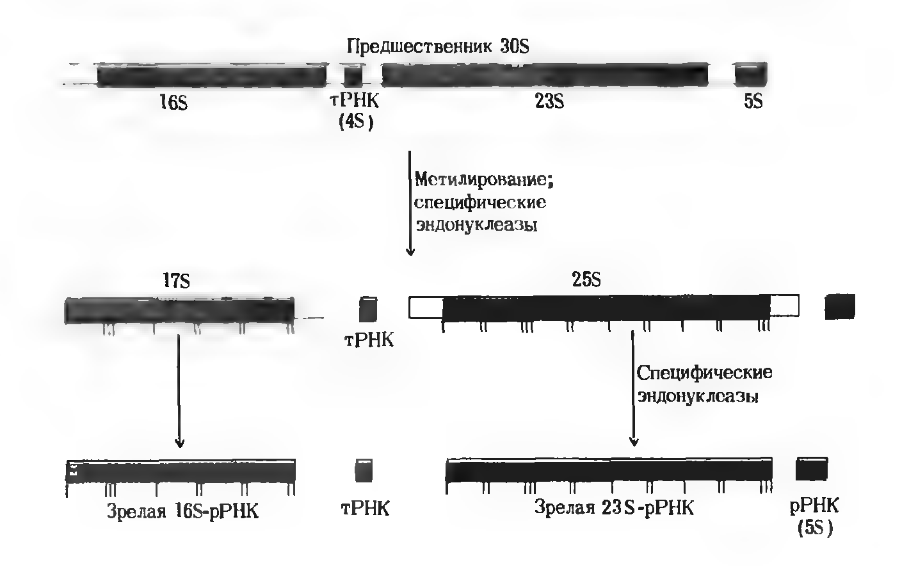
Рис. 28-18. Строение актиномицина D – ингибитора транскрипции ДНК. Часть молекулы, показанная на красном фоне, интеркалирует в двухцепочечную спираль ДНК, встраиваясь между двумя соседними GC-парами. Две циклические пептидные структуры молекулы актиномицина D располагаются в малой бороздке двойной спирали. Саркозин представляет собой N-метилглицин. Саркозин, L-пролин и D-валин соединены друг с другом пептидными связями.

субъединицей прокариотической РНК-полимеразы и препятствует инициации синтеза РНК. Однако у эукариот рифампицин не ингибирует синтез РНК. Специфическое ингибирующее действие на синтез РНК в животных клетках оказывает α-аманитин – токсичное начало ядовитого гриба *Amanita phalloides*. Этот ингибитор блокирует синтез матричной РНК, осуществляемый эукариотической РНК-полимеразой II, но не влияет на синтез РНК у прокариот. *Amanita phalloides* «поступает разумно», вырабатывая вещество, которое нарушает синтез РНК в прочих эукариотических организмах, но оказывается безвредным для его собственного транскрипционного аппарата.

28.21. Транскрипты РНК претерпевают дальнейшие превращения

Транскрипты РНК, синтезированные при помощи РНК-полимеразы, обычно претерпевают дальнейшие ферментативные превращения, называемые *посттранскрипционным процессингом*, и только после этого они обретают свою функциональную активность. рРНК и тРНК синтезируются в виде более длинных предшественников, которые затем модифицируются и расщепляются с образованием конечных продуктов. Транскрипты эукариотических мРНК

Рис. 28-19. Процессинг («созревание») транскрипта рРНК у прокариот. Зрелые молекулы 16S- и 23S-рРНК образуются из более длинного предшественника – 30S-РНК в результате действия специфических нуклеаз. Перед расщеплением 30S-РНК метилируется по определенным основаниям (отмечены красными вертикальными черточками). Из средней части предшественника образуется одна молекула тРНК.



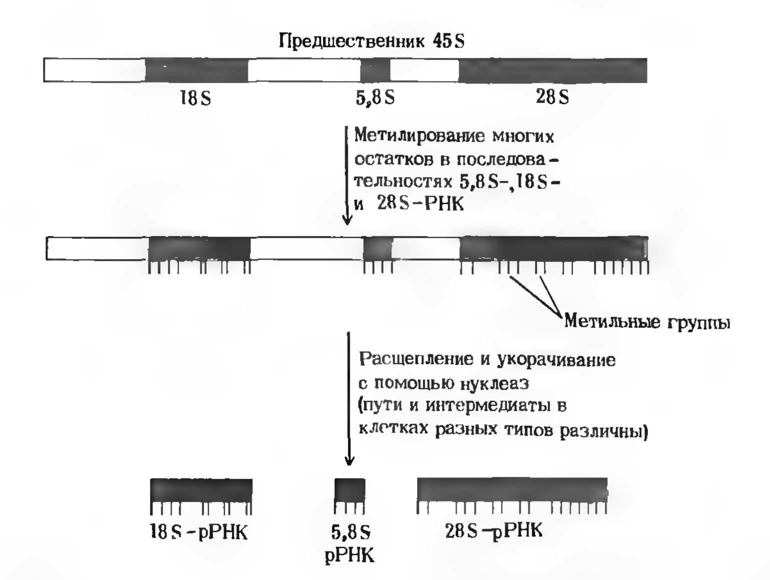


Рис. 28-20. Процессинг транскриптов эукариотических рРНК. Метилирование, представляющее собой первый этап процессинга, осуществляется по 2'-гидроксильным группам рибозных остатков в тех участках предшественника, которые сохраняются в зрелых РНК. 5S-рРНК образуется отдельно.

также подвергаются процессингу, тогда как у прокариотических мРНК он отсутствует.

рРНК как эукариотических, так и прокариотических клеток образуются из более длинных молекул-предшественников, называемых *прерибосомными РНК*. У прокариот 16S- и 23S-рРНК (гл. 29) образуются из одного длинного 30S-предшественника, молекулярная масса которого составляет приблизительно $2 \cdot 10^6$. Этот предшественник метилируется по специфическим основаниям и расщепляется, давая 17S- и 25S-промежуточные РНК, которые затем процессируются путем отщепления остатков с помощью нуклеаз, образуя характерные для прокариот 16S- и 23S-рРНК (рис. 28-19). 5S-рРНК образуется отдельно из 3'-концевого участка 30S-предшественника.

У эукариот 18S- и 28S-рРНК образуются в несколько этапов из большой 45S-прерибосомной РНК. Процессинг 45S-РНК протекает в ядрышке. Сначала происходит метилирование более чем 100 из 14 000 нуклеотидов 45S-предшественника; модификации подвергаются главным образом 2'-гидроксильные группы рибозных остатков. Как показано на рис. 28-20, метилированная 45S-РНК претерпевает затем ряд ферментативных расщеплений, приводящих в конечном итоге к появлению 18S-, 28S- и 5,8S-рРНК, характерных для эукариотических рибосом. 5S-рРНК эукариотов синтезируется отдельно.

тРНК также образуются из более длинных РНК-предшественников в результате ферментативного удаления лишних нуклеотидов с 5'- и 3'-концов молекулы. В некоторых случаях из одной длинной молекулы-предшественника в результате ферментативного расщепления образуются две и даже большее число разных тРНК. Как мы увидим ниже (разд. 29.20), существуют по меньшей мере 32 различные тРНК, а возможно, их гораздо больше.

В ходе посттранскрипционного процессинга в предшественниках тРНК наряду с удалением концевых последовательностей происходят изменения двоякого рода. Во-первых, к некоторым тРНК присоединяется 3'-концевая тринуклеотидная последовательность —C—C—A (3'); в других тРНК этот 3'-концевой тринуклеотид уже содержится в транскрипте. Ниже мы увидим, что

5′-трифосфатный конец

Основание

Основание

7-метилгуанозин

Рис. 28-21. «Кэп», представляющий собой остаток 7-метилгуанозина и расположенный на 5′-конце эукариотической мРНК; метильная группа выделена красным шрифтом. Обратите внимание на то, что «кэп» соединен с 5′-концевым нуклеотидом трифосфатным мостиком. Почти все эукариотические мРНК содержат 5′-«кэпы».

3′-концевой остаток А представляет собой именно ту часть молекулы тРНК, с которой ковалентно связывается соответствующая ей аминокислота перед включением в растущую полипептидную цепь на рибосоме. Во-вторых, ряд оснований в тРНК специфическим образом модифицируется: одни метилируются, другие дезаминируются, третьи восстанавливаются. Как мы увидим дальше (гл. 29), модифицированные основания располагаются во всех тРНК в определенных положениях.

28.22. Гетерогенные ядерные РНК служат предшественниками эукариотических матричных РНК

Процессинг предшественников матричных РНК у эукариот представляет собой очень сложный процесс. Эукариотические матричные РНК, обнаруживаемые в цитоплазме, обладают тремя отличительными структурными свойствами. Первое из них состоит в том, что эукариотические мРНК являются обычно моногенными молекулами, в то время как многие прокариотические мРНК – полигенны. Второе характерное свойство большинства эукариотических мРНК заключается в том, что они содержат на своем 3′-конце «хвост» из 100–200 последовательно присоединенных остатков А – так называемый poly (А)-хвост. Этот хвост синтезируется отдельно из молекул АТР с помощью *полиаденилатполимеразы*, которая работает в основном так же, как РНК-полимераза, и катализирует реакцию

$$n\text{ATP} \rightarrow (\text{AMP})_n + n\text{PP}_i$$

Полиаденилатполимеразе не нужна матрица, однако необходима мРНК в качестве затравки. Третья отличительная особенность большинства эукариотических мРНК – это наличие в них 5′-концевого «кэпа» (от англ. *cap* «шапка»), представляющего собой остаток 7-метилгуанозина, присоединенный к 5′-концевому остатку мРНК весьма необычным способом, а именно посредством трифосфатной связи (рис. 28-21). Функции «кэпа» и poly (А)-хвоста точно неизвестны. «Кэп», возможно, принимает участие в связывании мРНК с рибосомой, инициируя процесс трансляции (разд. 29.10). Не исключено также, что «кэп» и poly (А)-хвост предохраняют матричную РНК от ферментативного разрушения.

28.23. Из предшественников мРНК должны быть удалены интроны

В эукариотическом ядре мРНК должны пройти дальнейшие стадии процессинга, заключающиеся в удалении интронов (разд. 27.28). В ядре присутствует РНК особого класса, которая при синтезе белка очень быстро обновляется. Эта РНК носит название *гетерогенной ядерной РНК* (*гяРНК*) и состоит из смеси очень длинных молекул РНК. Хотя уже давно предполагали, что молекулы гяРНК служат предшественниками цитоплазматических матричных РНК, тем не менее исследователей смущало несоответствие между структурами гяРНК и зрелых цитоплазматических мРНК. Дело в том, что гяРНК по размеру гораздо больше, чем мРНК; к тому же для первой характерно большее разнообразие нуклеотидных последовательностей, чем для второй. Довольно долго эта проблема казалась загадочной, но ее решение стало реальным после открытия в эукариотических генах нетранслируемых *вставочных последовательностей*, или *интронов*. Напомним, что интроны часто оказываются гораздо длиннее экзонов, т. е. кодирующих частей гена (разд. 27.28). После обнаружения в ДНК интронов естественно встал вопрос: транскрибируются ли они коллинеарным образом вместе с экзонами, образуя очень длинный предшественник мРНК, комплементарный и коллинеарный как экзонам, так и интронам, или же РНК-полимераза «перескакивает» через интроны и транскрибирует только экзоны.

Этот вопрос был выяснен. Оказалось, что эукариотическая РНК-полимераза транскрибирует и экзоны, и интроны, причем точно в той последовательности, в которой они находятся в гене. При этом образуются очень длинные предшественники РНК, которые содержат участки нетранслируемой РНК, комплементарные нуклеотидным последовательностям интронов ДНК. Такие предшественники мРНК представляют собой значительную часть гяРНК и обнаруживаются только в ядре. Кроме того, именно наличием интронов объясняются структурные соотношения между гяРНК и соответствующими цитоплазматическими мРНК. Но как только была решена одна загадка, сразу же возникла другая.

Нужно было ответить на вопрос, каким образом ядерный предшественник мРНК, содержащий блоки интронов, превращается в зрелую цитоплазматическую мРНК, в которой эти блоки должны отсутствовать? Если бы предшественник мРНК просто расщеплялся в каждой точке, где кончается экзон и начинается интрон или, наоборот, кончается интрон и начинается экзон, то в результате этого в ядре образовалось бы большое число фрагментов предшественника мРНК, часть из которых кодирует участки полипептидной цепи, а часть не транслируется. Как можно собрать разобщенные кодирующие фрагменты в правильном порядке и соединить их, чтобы получилась зрелая мРНК?

28.24. Малые ядерные РНК помогают удалять интроны из РНК

Имеющиеся в настоящее время данные позволяют ответить на эти вопросы. Они свидетельствуют о том, что удаление нетранслируемых интронов при процессинге предшественников мРНК протекает таким образом, что следующие друг за другом экзоны, т. е. кодирующие фрагменты мРНК, никогда физически не разобщаются. Экзоны очень точно соединяются между собой с помощью молекул другого класса РНК, присутствующих в ядре и называемых *малыми ядерными РНК (мяРНК)*. Функция этих коротких ядерных РНК, состоящих приблизительно из ста нуклеотидов, долго оставалась непонятной. Ее удалось установить после того, как было обнаружено, что их нуклеотидная последовательность комплементарна последовательностям на концах каждого из интронов. В результате спаривания оснований, содержащихся в мяРНК и на концах свернутого в петлю интрона, последовательности двух экзонов сближаются таким образом, что становится возможным удаление разделяю-

щего их интрона и ферментативное соединение (сплайсинг) кодирующих фрагментов (экзонов). Таким образом, молекулы мяРНК играют роль временных матриц, удерживающих близко друг от друга концы двух экзонов для того, чтобы сплайсинг произошел в правильном месте (рис. 28-22). Важность

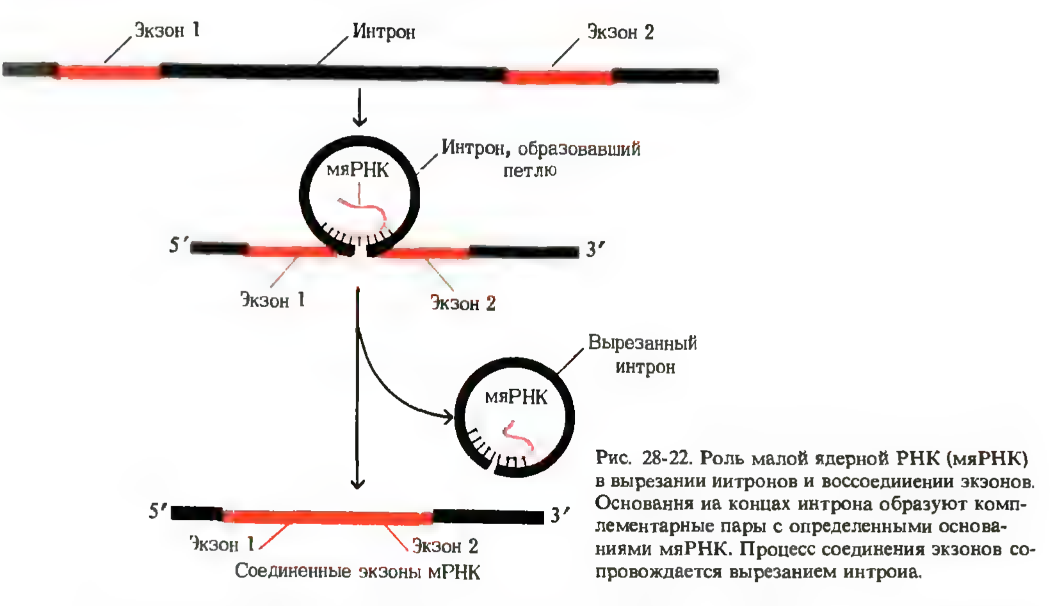


Рис. 28-22. Роль малой ядерной РНК (мяРНК) в вырезании интронов и воссоединении экзонов. Основания на концах интрона образуют комплементарные пары с определенными основаниями мяРНК. Процесс соединения экзонов сопровождается вырезанием интрона.

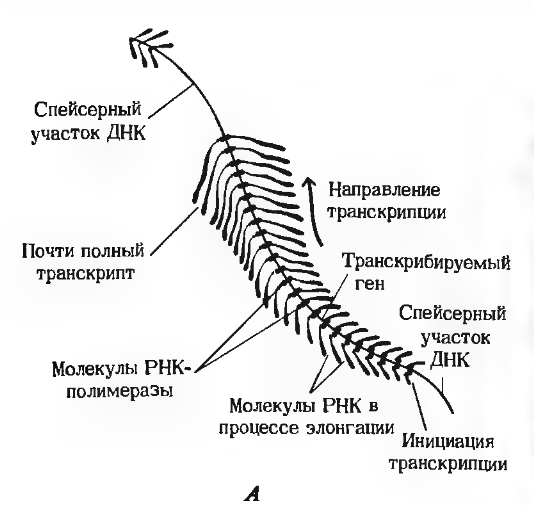
этого процесса состоит в том, что ошибка всего лишь в один нуклеотид при сплайсинге может изменить рамку считывания в последовательности, расположенной после этой точки, и привести к синтезу на такой мРНК дефектной молекулы белка.

После того как таким путем из РНК удаляются все интроны и тем самым завершается процессинг предшественника мРНК, зрелая мРНК покидает ядро. Чтобы сделать это, мРНК сначала связывается с двумя специальными белками, которые проводят мРНК в цитоплазму сквозь поры в ядерной оболочке (разд. 2.7). Эти поры, окруженные сложным ансамблем белковых молекул, пропускают из ядра, по-видимому, только полностью «созревшие» мРНК. Обрывки РНК, оставшиеся после процессинга, расщепляются нуклеазами. Образовавшиеся при этом нуклеозид-5′-монофосфаты переводятся с помощью АТР в нуклеозид-5′-трифосфаты и вновь используются для синтеза РНК в ядре.

28.25. За процессом транскрипции можно наблюдать

В ооцитах южноафриканской шпорцевой лягушки *Xenopus* содержится большое число копий генов, кодирующих рРНК. Эти гены необходимо транскрибировать очень быстро, чтобы обеспечить образование рибосом, которые нужны для быстрого деления клеток и роста ранних эмбрионов после оплодотворения. При электронной микроскопии таких клеток выявляется много тонких петлеобразных *осевых нитей* диаметром около 20 нм, покрытых через определенные интервалы похожими на волоски *радиальными фибриллами*, которые постепенно увеличиваются в размерах (рис. 28-23). Непрерывная осевая нить, проходящая через эти структуры, состоит из ДНК, связанной с белком. Боковые, похожие на волоски фибриллы представляют собой не что иное, как растущие цепи РНК. Расположенные друг за другом участки ДНК, покрытые фибриллами РНК,–это повторяющиеся гены рРНК: все они активно транскрибируются. Одновременно с одного гена тран-

скрибируется большое число цепей РНК, каждая из которых синтезируется молекулой РНК-полимеразы, перемещающейся от одного конца гена к другому. По мере движения фермента вдоль гена происходит удлинение цепей РНК. Темные точки на ДНК, лежащие в основании фибрилл РНК, представляют со-



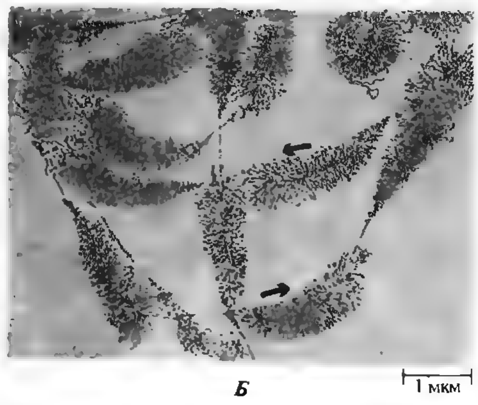


Рис. 28-23. *А.* Схема, поясняющая процесс транскрипции. Благодаря образованию вторичной структуры новосинтезированные одноцепочечные молекулы РНК выглядят гораздо короче, чем ДНК, с которой они транскрибированы. *Б.* Электронная микрофотография рибосомных генов *Xenopus* в процессе транскрипции, осуществляемой одновременно большим числом молекул РНК-полимеразы.

бой молекулы ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Эти молекулы очень сильно сближены между собой: они движутся вдоль гена вплотную одна за другой, как говорят, бампер к бамперу. Размер участка ДНК, на котором происходит транскрипция, составляет 2–3 мкм, что приблизительно соответствует длине ДНК, необходимой для кодирования 45S-предшественника рРНК эукариот. Нетранскрибируемые участки осевой нити представляют собой спейсерную ДНК.

28.26. У РНК-содержащих вирусов ДНК считывается при помощи обратной транскриптазы.

Некоторые онкогенные РНК-содержащие вирусы животных, такие, как *вирус саркомы Рауса*, имеют уникальный фермент – РНК-зависимую ДНК-полимеразу, часто называемую *обратной транскриптазой*. После того как такой вирус попадает в клетку-хозяина, этот фермент способен катализировать синтез ДНК, комплементарной по отношению к вирусной РНК, которая играет при этом роль матрицы. В результате образуется ДНК, которая содержит гены, обусловливающие рак; эта ДНК часто встраивается в геном эукариотической клетки-хозяина, где она может в течение многих поколений оставаться в скрытом, т. е. неэкспрессируемом, состоянии (рис. 28–24). При определенных условиях такие бездействующие вирусные гены могут активироваться и вызывать репликацию вируса; при других же условиях они могут способствовать превращению такой клетки в раковую.

Существование обратных транскриптаз в РНК-содержащих онкогенных вирусах было предсказано еще в 1962 г. Говардом Темином из Висконсинского университета, а наличие их в этих вирусах было в конце концов продемонстрировано в 1970 г. как самим Темином, так и не-

зависимо от него Дэвидом Балтимором из Массачусетского технологического института. Их открытие привлекло большое внимание главным образом потому, что оно представляло собой доказательство возможности передачи генетической информации в направлении от РНК к ДНК. Оно позволило представить, каким способом включаются в геном клетки-хозяина онкогены, находящиеся в РНК-содержащих вирусах в виде РНК. Именно благодаря этому открытию пришлось по-иному сформулировать центральную догму молекулярной биологии (рис. 28-25). Обладающие обратной транскриптазой РНК-содержащие вирусы называют также *ретровирусами*



Рис. 28-25. Расширенное толкование центральной догмы молекулярной генетики, учитывающее возможность передачи генетической информации от РНК к ДНК в связи с открытием обратных транскриптаз.

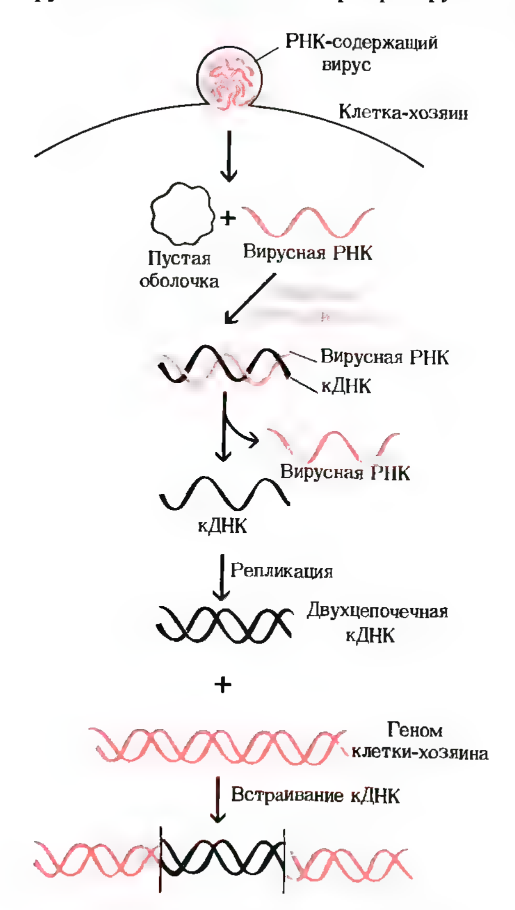


Рис. 28-24. Участие обратной транскриптазы в образовании комплементарной ДНК на вирусной одноцепочечной РНК-матрице в животной клетке. Полученная кДНК может встраиваться в геном клетки-хозяина.

(«ретро» по-латыни означает «назад»).

Обнаружение обратной транскриптазы позволило ответить на давний вопрос: как генетическая информация онкогенных РНК-содержащих вирусов может включаться в ДНК клетки-хозяина? Сейчас накапливается все больше данных о том, что в ДНК многих видов животных присутствуют гены, берущие начало от РНК-содержащих вирусов, даже если животные, из которых эта ДНК выделена, сами не подвергались воздействию таких вирусов. Эти наблюдения заставляют предположить, что гены ряда РНК-содержащих вирусов когда-то, возможно на ранних этапах биологической эволюции этих видов, транскрибировались в ДНК и встроились в хромосомы предков этих животных. После этого они передавались из поколения в поколение при репликации всей ДНК клетки, в том числе и содержащихся в ней онкогенов, исходно принадлежавших вирусной РНК. Действительно, согласно одной из теорий происхождения рака, считается, что все мы несем в хромосомах «спящие», неэкспрессируемые, онкогены, которые попали в геном наших предков в виде РНК-содержащих вирусов, возможно, тысячи или миллионы лет назад. Эта теория далее предполагает, что такие онкогены обычно не транскрибируются, но если их активировать, например, воздействием канцерогенных агентов, то они транскрибируются и транслируются

с образованием продуктов, вызывающих трансформацию нормальных клеток человека в злокачественные.

Вирусные обратные транскриптазы, так же как все ДНК- и РНК-полимеразы, содержат ионы Zn^{2+}. Они проявляют наибольшую активность при использовании в качестве матрицы РНК своего вируса, но способны синтезировать также ДНК, комплементарную к самым разным РНК. Обратным транскриптазам необходима затравка; синтез новой цепи ДНК они ведут в направлении $5' \to 3'$ и вообще во многих отношениях напоминают ДНК-полимеразы.

Обратная транскриптаза, подобно рестриктирующим эндонуклеазам (разд. 27.24), стала, как мы увидим дальше, очень важным биохимическим инструментом при изучении взаимоотношений ДНК–РНК, а также процесса клонирования ДНК. Этот фермент сделал возможным искусственный синтез ДНК, комплементарной любой матрице РНК, будь то мРНК, тРНК или рРНК. Синтетическую ДНК, полученную таким путем, называют *комплементарной ДНК (кДНК)*. С помощью обратной транскриптазы можно, например, получить синтетический ген (т.е. кДНК), кодирующий одну из полипептидных цепей гемоглобина, исходя из ее мРНК. мРНК, кодирующие цепи гемоглобина, легко могут быть выделены из эритроцитов. В этом и во многих других случаях, когда выделение природного гена, кодирующего какой-либо полипептид эукариот, довольно сложно, а его мРНК доступна, можно получить синтетический ген этой мРНК при помощи обратной транскриптазы. Позже мы увидим, как кДНК используются для клонирования рекомбинантных ДНК (гл. 30).

28.27. Некоторые вирусные РНК реплицируются с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы

У некоторых бактериофагов *E. coli* хромосома представляет собой не ДНК, а РНК. Эти вирусы, к которым относятся такие фаги, как, например, f2, MS2, R17 и Qβ (табл. 27-1), стали важным средством исследования структуры и функции мРНК. РНК этих вирусов, которые при синтезе вирусных белков выступают в роли мРНК, реплицируются в клетке-хозяине под действием ферментов, называемых *РНК-зависимыми РНК-полимеразами*, или *РНК-репликазами*. Эти ферменты обычно отсутствуют в клетках *E. coli* и появляются в них лишь в ответ на присутствие вирусных РНК.

РНК-репликаза, выделенная из клеток *E. coli*, зараженных вирусом Qβ, катализирует образование РНК, комплементарной вирусной РНК, из рибонуклеозид-5'-трифосфатов. Уравнение этой реакции аналогично уравнению реакции, катализируемой ДНК-зависимой РНК-полимеразой:

$$\text{NTP} + \underset{\text{РНК}}{(\text{NMP})_n} \xrightarrow{\text{Вирусная РНК-матрица}} \underset{\text{Удлиненная РНК}}{(\text{NMP})_{n+1}} + \text{PP}_i$$

Синтез новой цепи РНК происходит в направлении $5' \to 3'$. РНК-репликаза не может использовать в качестве матрицы ДНК; для этой цели ей необходима РНК. В отличие от ДНК- и РНК-полимераз РНК-репликазы обладают специфичностью к матрице. Так, РНК-репликаза фага Qβ способна использовать в качестве матрицы только РНК этого вируса, а РНК клетки-хозяина этим ферментом не реплицируются. Это обстоятельство объясняет, почему РНК-содержащие вирусы имеют преимущество при репликации своей РНК в клетке-хозяине, содержащей большое число РНК других видов.

Таким образом, очищенная РНК-репликаза вируса Qβ может осуществлять синтез новых биологически активных молекул Qβ-РНК. Используя в качестве матрицы инфекционную (+)-цепь РНК вируса, очищенная репликаза способна синтезировать комплементарную (−)-цепь, которая затем в присутствии того же фермента может служить матрицей для образования полностью инфекционной Qβ-РНК, идентичной с исходной (+)-нитью. Из этого следует, что центральная догма молекулярной генетики

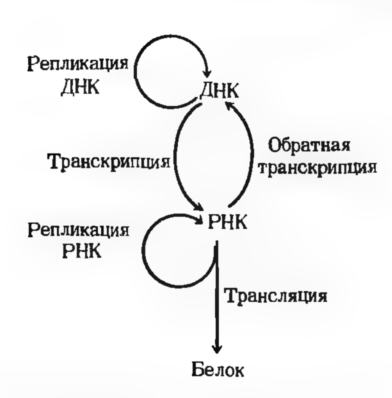


Рис. 28-26. Дальнейшее уточнение центральной догмы с учетом возможности репликации РНК.

должна быть сформулирована в несколько измененной форме, приведенной на рис. 28-26.

Расшифровка полной нуклеотидной последовательности РНК-хромосомы вируса R17 и аминокислотных последовательностей трех вирусных белков, кодируемых этой РНК, позволила получить важную дополнительную информацию о генетическом коде и о специфических сигналах инициации и терминации синтеза полипептидных цепей (гл. 29).

28.28. Полинуклеотидфосфорилаза позволяет осуществлять синтез РНК-подобных полимеров с неспецифической нуклеотидной последовательностью

В 1955 г. Марианна Грюнберг-Манаго и Северо Очоа обнаружили *полинуклеотидфосфорилазу* – первый фермент, оказавшийся способным синтезировать длинные цепи полинуклеотидов. (Чуть позже Артур Корнберг сообщил об открытии ДНК-полимеразы.) Полинуклеотидфосфорилаза, которая, видимо, встречается только в бактериях, катализирует реакцию

$$NDP + (NMP)_n \rightleftarrows (NMP)_{n+1} + P_i$$

где NDP – нуклеозид-5'-дифосфат, $(NMP)_{n+1}$ – удлиненный полинуклеотид, а P_i – отцепившийся фосфат. Ферменту необходимы 5'-дифосфаты рибонуклеозидов; с рибонуклеозид-5'-трифосфатами, с дезоксирибонуклеозид-5'-дифосфатами или в отсутствие ионов Mg^{2+} он работать не может. Полинуклеотидфосфорилаза катализирует синтез РНК-подобного полимера, содержащего 3',5'-фосфодиэфирные связи, которые гидролизуются рибонуклеазой. Реакция гидролиза легко обратима и может быть сдвинута в сторону расщепления полирибонуклеотида путем увеличения концентрации фосфата.

Полинуклеотидфосфорилаза не требует матрицы и не синтезирует полимер со специфической нуклеотидной последовательностью. Цепь РНК необходима ей лишь в качестве затравки, которая просто обеспечивает наличие свободного 3'-гидроксильного конца, к которому могут присоединяться дополнительные остатки. Реакция протекает как в присутствии всех четырех исходных мономеров, так и в присутствии только одного из них. Нуклеотидный состав образующегося полимера отражает относительное соотношение в среде 5'-дифосфатов-предшественников. Поэтому маловероятно, чтобы в естественных условиях полинуклеотидфосфорилаза выполняла функцию РНК; скорее она участвует в деградации РНК.

Полинуклеотидфосфорилаза – очень ценный инструмент исследования, поскольку ее можно использовать для получения в лаборатории многочисленных РНК-подобных полимеров с различной нуклеотидной последовательностью и разным содержанием оснований. Такие синтетические РНК-полимеры позволили, как мы увидим дальше (гл. 29), составить словарь кодовых «слов» для аминокислот.

Краткое содержание главы

ДНК *E. coli* реплицируется полуконсервативным способом, так что каждая дочерняя двойная спираль состоит из одной родительской и одной новообразованной цепи. Кольцевая бактериальная хромосома реплицируется в двух направлениях из одной и той же точки начала репликации. Некоторые вирусные ДНК реплицируются по механизму «катящегося кольца».

ДНК-полимераза I *E. coli* катализирует

синтез ДНК из четырех дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфатов в присутствии ионов Mg^{2+} с высвобождением в ходе реакции пирофосфата. Цепь растет в направлении 5′ → 3′. Для протекания реакции необходимо наличие предсуществующей цепи ДНК, которая служит одновременно и матрицей, и затравкой. Фермент синтезирует цепь ДНК, комплементарную цепи-матрице; полярность новообразованной цепи противоположна полярности матрицы. Клетки *E. coli* содержат три ДНК-полимеразы. Главный фермент репликации – это ДНК-полимераза III, а ДНК-полимераза I выполняет при репликации вспомогательную функцию. Одна цепь ДНК (ведущая) реплицируется непрерывным образом в направлении 5′ → 3′, другая же цепь (отстающая) реплицируется с образованием коротких фрагментов, называемых фрагментами Оказаки. Эти фрагменты, длина которых у прокариот может достигать 2000 нуклеотидов, синтезируются в направлении, противоположном направлению движения репликативной вилки. Образование каждого фрагмента Оказаки начинается с катализируемого праймазой синтеза короткого комплементарного участка РНК, который играет роль затравки. Затем на 3′-конце этой РНК-затравки с помощью ДНК-полимеразы III синтезируется ДНК. После этого РНК-затравка вырезается и замещается комплементарной ДНК, которая затем сшивается с отстающей цепью при помощи ДНК-лигазы. Для репликации необходимы также хеликаза и ДНК-связывающие белки, которые расплетают матрицу и удерживают цепи ДНК в разведенном состоянии, помогая ДНК-полимеразе начать работу. Кроме того, расплетанию цепей способствует вращение молекулы ДНК, осуществляемое ДНК-гиразой. После репликации ДНК-гираза необходима также для образования сверхспиральных молекул ДНК. ДНК-полимераза I обладает как 3′ → 5′-, так и 5′ → → 3′-экзонуклеазной активностью. Первая из них служит для исправления ошибок – с ее помощью выщепляются неспаренные нуклеотиды, тогда как вторая активность обеспечивает удаление РНК-затравок из фрагментов Оказаки и репарацию ДНК. ДНК-полимераза III тоже обладает этими экзонуклеазными активностями.

Процесс транскрипции катализируется ДНК-зависимой РНК-полимеразой – сложным ферментом, который синтезирует из рибонуклеозид-5′-трифосфатов цепь РНК, комплементарную одной из цепей двухцепочечной ДНК. Для узнавания промоторной области ДНК, т. е. сигнала инициации синтеза РНК, прокариотической РНК-полимеразе необходима особая субъединица σ (сигма). С одного гена одновременно может транскрибироваться много цепей РНК. рРНК и тРНК образуются из более длинных РНК-предшественников, которые укорачиваются с помощью нуклеаз и далее ферментативным путем модифицируются, превращаясь в зрелые молекулы. Эукариотические мРНК образуются из предшественников большего размера, которые известны под названием гетерогенных ядерных РНК (гяРНК). Впоследствии они модифицируются путем присоединения длинного poly(A)-хвоста к 3′-концу и остатка метилгуанозина («кэпа») к 5′-концу. Интроны удаляются с помощью малых ядерных РНК (мяРНК).

В животных клетках, зараженных онкогенными РНК-содержащими вирусами, образуются РНК-зависимые ДНК-полимеразы, называемые также обратными транскриптазами. Эти ферменты транскрибируют вирусную РНК-хромосому с образованием комплементарной ДНК. Таким путем гены, обусловливающие рак (онкогены), могут включаться в геном животных клеток.

В бактериальных клетках, зараженных некоторыми РНК-содержащими вирусами, были найдены РНК-зависимые РНК-репликазы. Они обладают специфичностью по отношению к вирусной РНК-матрице. Выделенная из бактерий полинуклеотидфосфорилаза может обратимо синтезировать РНК-подобные полимеры из рибонуклеозид-5′-дифосфатов. Хотя этот фермент способен добавлять рибонуклеотиды к 3′-гидроксильному концу полимера и удалять их оттуда, обычно он выполняет функцию деградации РНК.

ЛИТЕРАТУРА

Репликация

Alberts B., Sternglanz R. Recent Excitement in the DNA Replication Problem, Nature, **269**, 655–661 (1977). Прекрасный обзор сложных проблем, касающихся репликации и сверхспиральности молекул ДНК, а также расплетания и точности воспроизведения цепей ДНК.

Kornberg A. Aspects of DNA Replication, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **43**, 1–9 (1979). Обзор современного состояния проблемы репликации ДНК и постановка новых вопросов. Указанный том содержит множество ценных статей.

Kornberg A. DNA Replication, Freeman, San Francisco, Calif., 1980. Самая последняя монография по репликации, ДНК, содержащая полный перечень ссылок по данной проблеме.

ДНК-лигаза

Lehman I. R. DNA Ligase: Structure, Mechanism, Function, Science, **186**, 790–797 (1974).

Транскрипция

Chamberlin M. J. RNA Polymerase: An Overview. In: Losick R. and Chamberlin M. J. (eds.), RNA Polymerase, pp. 17–67, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1976.

Miller O. L., Jr. The Visualization of Genes in Action, Sci. Am., **228**, 34–42, March 1973.

Pederson T. Messenger RNA Biosynthesis and Nuclear Structure, Am. Sci., **69** (1), 76–84 (1981).

Обратная транскрипция

Temin H. RNA-Directed DNA Synthesis, Sci. Am., **226**, 24–33, January 1972.

Процессинг РНК

Abelson J. RNA Processing and the Intervening Sequence Problem, Annu. Rev. Biochem., **48**, 1035–1069 (1979).

Вопросы и задачи

1. *Выводы из эксперимента Мезельсона – Сталя.* Результаты эксперимента Мезельсона – Сталя доказали, что репликация ДНК в *E. coli* протекает по полуконсервативному механизму. Согласно так называемой «дисперсивной» модели, цепи родительской ДНК расщепляются при репликации на фрагменты произвольного размера, а затем соединяются с фрагментами новосинтезированной ДНК, образуя дочерние дуплексы, в которых обе цепи содержат в случайном порядке как родительскую («тяжелую»), так и дочернюю («легкую») ДНК. Объяснште, почему эксперимент Мезельсона – Сталя исключил эту модель.
2. *Эксперимент Кэрнса.*
   а) Почему Кэрнс при изучении хода репликации ДНК использовал радиоактивный тимидин?
   б) Можно ли было с тем же успехом использовать радиоактивный аденозин или гуанозин?
   в) Покажите ферментативный путь, по которому радиоактивный тимидин включается в ДНК *E. coli.*
3. *Число оборотов хромосомы E. coli.* Сколько оборотов вокруг своей оси должна совершить хромосома *E. coli* при раскручивании в процессе репликации?
4. *Время репликации у E. coli.*
   а) Исходя из данных, приведенных в этой главе, рассчитайте, сколько времени занимает репликация хромосомы *E. coli* при 37°С, если две репликативные вилки движутся из точки начала репликации?
   б) При определенных условиях клетки *E. coli* могут расти и делиться с интервалами в 20 мин. Объясните, каким образом это происходит?
5. *Репликативные вилки в E. coli и в клетках человека.*
   а) Какое время необходимо для репликации гена рибонуклеазы *E. coli* (104 аминокислотных остатка), если репликативная вилка движется со скоростью 750 пар оснований в секунду?
   б) Репликативная вилка в клетке человека движется всего лишь в 10 раз медленнее, чем в *E. coli.* Какая дополнительная информация потребуется вам, чтобы рассчитать минимальную скорость репликации гена человека, кодирующего белок из 104 аминокислотных остатков?
6. *Спаривание оснований при репликации и транскрипции.*
   а) Напишите нуклеотидную последовательность участка ДНК, синтезируемого ДНК-полимеразой, на указанной ниже матрице ДНК, имея в виду, что нуклеотидные последовательности принято писать в направлении 5′ → 3′.
   (5′) AGCTTGCAACGTTGCATTAG (3′)
   б) Теперь напишите нуклеотидную последовательность участка матричной РНК, транскрибируемой РНК-полимеразой при использовании в качестве матрицы новосинтезированной цепи ДНК, полученной в п. а) этой задачи.

7. *Состав оснований транскрипта РНК.* Цепь ДНК, содержащая 10^5 нуклеотидных остатков в соотношении A 21%, G–29%, C–29% и T–21%, реплицируется при помощи ДНК-полимеразы с образованием комплементарной цепи. Полученную двухцепочечную ДНК затем используют в качестве матрицы для РНК-полимеразы, которая транскрибирует новую цепь ДНК. В результате синтезируется РНК такого же размера, как матрица.
   а) Определите нуклеотидный состав образующейся РНК.
   б) Предположим, что РНК-полимераза остановилась, пройдя только 2000 остатков новой цепи ДНК. Каким будет нуклеотидный состав новой короткой РНК?
8. *Нуклеотидный состав ДНК, синтезированных на одноцепочечных матрицах.* Определите нуклеотидный состав ДНК, синтезированной на матрице, представляющей собой двухцепочечную кольцевую ДНК фага фX174 (т. е. репликативную форму ДНК этого фага), если нуклеотидный состав одной из цепей таков: A–24,7%, G–24,1%, C–18,5% и T–32,7%. Какое допущение необходимо сделать, чтобы решить эту задачу?
9. *Гибридизация ДНК с мРНК.* ДНК гибридизуется с мРНК, транскрибированными с этой ДНК. Как вы объясните тот факт, что со всеми известными мРНК может гибридизоваться не более 50% всей ДНК *E. coli*?
10. *Фрагменты Оказаки.*
    а) Сколько приблизительно фрагментов Оказаки образуется при репликации хромосомы *E. coli*?
    б) Какие факторы гарантируют сборку большого числа фрагментов Оказаки в новую ДНК в правильном порядке?
11. *Ведущая и отстающая цепи.* Составьте список предшественников и ферментов, необходимых для синтеза ведущей и отстающей цепей при репликации ДНК.
12. *Точность репликации ДНК.*
    а) Какие факторы обеспечивают точность репликации в ходе синтеза ведущей цепи новой ДНК?
    б) Можно ли ожидать, что отстающая цепь синтезируется с той же точиостью, что и ведущая? Поясиите ваш ответ.
13. *Инициация репликации.* ДНК-репликазная система для своего функционирования нуждается в матрице и затравке; более того, она не способна реплицировать интактную кольцевую ДНК, за исключением особых обстоятельств.
    а) Каков биологический смысл этого свойства репликазной системы?
    б) Каковы могут быть особые обстоятельства, при которых ДНК-репликазная система способна реплицировать интактную кольцевую ДНК?
14. *Различия между РНК-полимеразой и полинуклеотидфосфорилазой.* РНК-полимераза требует для транскрипции в качестве предшественников нуклеозид-5′-трифосфаты, а с нуклеозид-5′-дифосфатами она не работает. Полинуклеотидфосфорилаза, наоборот, требует нуклеозид-5′-дифосфаты, а с 5′-трифосфатами она не работает.
    а) Какова причина указаниых различий между этими двумя ферментами в требовании к предшественникам?
    б) В связи с вашим ответом на вопрос п. «а» укажите, какие другие различия между данными ферментами имеют отношение к затронутому вопросу.
15. *Исправление ошибок.* ДНК-полимеразы могут выявлять и исправлять ошибки, тогда как РНК-полимеразы такой способностью, по-видимому, не обладают. Поскольку ошибка даже в одном основаиии как при репликации, так и при транскрипции может привести к ошибке в синтезе белка, можете ли вы дать биологическое объяснение этому поразительному различию?

ГЛАВА 29

СИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

Механизм биосинтеза белков со всем многообразием их биологической активности и видовой специфичности был одной из крупнейших проблем в истории биохимии. В течение многих лет невозможно было ответить даже на очень простые вопросы относительно белкового синтеза. Например, образуются ли белки сразу как одно целое или же создаются путем сборки из множества коротких предварительно синтезированных пептидов? Или такой вопрос: может быть, все белки клетки образуются из одного длинного полипептида-предшественника в результате специфических изменений его боковых (R) групп? До начала 1950-х годов не было достоверно установлено даже то, что белки – это индивидуальные химические соединения с определенной молекулярной массой, определенным аминокислотным составом и определенной последовательностью аминокислотных остатков.

Сегодня мы уже многое знаем о процессе белкового синтеза, однако не исключено, что это лишь малая часть того, что нам еще предстоит узнать. По всей вероятности, синтез белка представляет собой самый сложный из биосинтетических процессов: он требует очень большого числа ферментов и других специфических макромолекул. В эукариотических клетках в белковом синтезе принимают участие свыше 70 различных рибосомных белков, не менее 20 ферментов, необходимых для активации аминокислот-предшественников, более десятка вспомогательных ферментов и других особых белковых факторов инициации, элонгации и терминации синтеза полипептидов, а также, возможно, не менее 100 дополнительных ферментов, участвующих в процессинге (созревании) белков. Если добавить к этому списку еще свыше 70 видов транспортных и рибосомных РНК, то станет ясно, что синтез полипептидов требует совместного действия почти трехсот различных макромолекул. К тому же многие из этих макромолекул организованы в сложные трехмерные структуры рибосом, в которых по мере синтеза полипептидной цепи происходит перемещение (транслокация) мРНК.

Несмотря на большую сложность аппарата биосинтеза белковых молекул, их синтез протекает с чрезвычайно высокой скоростью. К примеру, на образование полипептидной цепи, состоящей из ста аминокислотных остатков, рибосоме *E. coli* достаточно пяти секунд. Более того, как мы увидим ниже, синтез тысяч различных белков в каждой клетке строго упорядочен, так что при данных условиях метаболизма синтезируется лишь необходимое число молекул каждого белка.

29.1. Открытия раннего периода заложили основу исследований биосинтеза белка

Основа наших сегодняшних представлений о биосинтезе белка была заложена в результате трех главных открытий 50-х годов. В начале 50-х годов Пол Замечник и его коллеги из Главного Массачусетского Госпиталя задались вопросом: в каком месте клетки синтезируются белки? В поисках ответа они вводили крысам радиоактивные аминокислоты.

Через разные промежутки времени после инъекции они извлекали печень, гомогенизировали ее, фракционировали путем центрифугирования (разд. 13.16) и проверяли затем полученные субклеточные фракции на наличие в них радиоактивного белка. Если после введения меченых аминокислот проходили часы или дни, то меченые белки обнаруживали во всех внутриклеточных фракциях. Если же печень извлекали и фракционировали всего через несколько минут после инъекции меченых аминокислот, то новообразованный меченый белок обнаруживали лишь во фракции, содержащей небольшие рибонуклеопротеиновые частицы. Исходя из этих данных, был сделан вывод о том, что местом синтеза белка из аминокислот являются рибонуклеопротеиновые частицы, которые ранее уже были обнаружены в животных тканях с помощью электронного микроскопа (разд. 2.17); позже они получили название *рибосом* (рис. 29-1).

Второе открытие было сделано Мэлоном Хоглендом и Полом Замечником, которые обнаружили, что инкубация аминокислот с АТР и цитозольной фракцией клеток печени приводит к активации аминокислот. В ходе этого ферментативного процесса аминокислоты присоединялись к термостабильной растворимой РНК особого типа, названной позднее *транспортной РНК (тРНК)*.

Третье из упомянутых выше главных открытий принадлежит Френсису Крику, который задумался над вопросом о том, каким образом генетическая информация, закодированная в нуклеиновых кислотах с помощью четырехбуквенного языка, переводится на двадцатибуквенный язык белков. Крик пришел к выводу, что тРНК должны выполнять в данном процессе роль *адаптора*. При этом одна часть молекулы тРНК может связываться со специфической аминокислотой, а какая-то другая ее часть – узнавать в мРНК короткую нуклеотидную последовательность, которая кодирует эту аминокислоту (рис. 29-2).

Именно эти три открытия привели вскоре к выяснению основных этапов биосинтеза белка и в конечном счете



Рис. 29-1. Участок клетки поджелудочной железы, на котором видны рибосомы, прикрепленные к внешней поверхности эндоплазматического ретикулума.

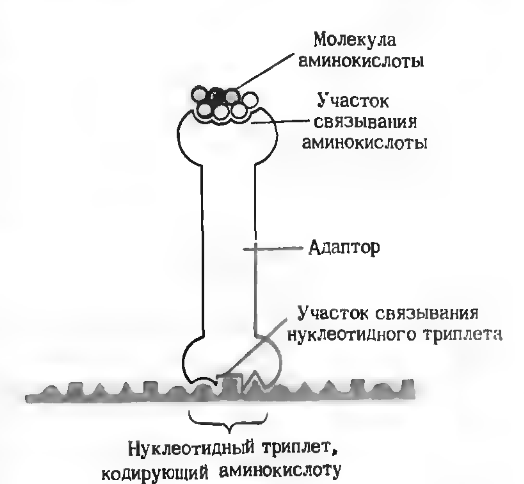


Рис. 29-2. Гипотеза Крика об адапторной функции тРНК. Сегодня мы знаем, что аминокислота соединена с тРНК ковалентно, а специфический триплет нуклеотидов в другом участке молекулы тРНК «узнает» кодирующий триплет мРНК посредством образования водородных связей между комплементарными основаниями.

к установлению генетического кода для аминокислот.

29.2. Синтез белка протекает в пять основных этапов

Сегодня мы знаем, что процесс белкового синтеза протекает в пять основных этапов, каждый из которых требует ряда компонентов. В табл. 29-1 перечислены компоненты, необходимые для синтеза белка в *E. coli* и других прокариотах. Белковый синтез в эукариотических клетках протекает в принципе по той же схеме, несколько отличаясь от синтеза в прокариотах в деталях. Ниже дана краткая характеристика этапов биосинтеза белка.

Таблица 29-1. Компоненты, необходимые для осуществления пяти основных этапов полипептидного синтеза в *E. coli*

Этап	Необходимые компоненты
1. Активация аминокислот	20 аминокислот 20 аминоацил-тРНК–синтетаз 20 или больше тРНК ATP Mg^{2+}
2. Инициация полипептидной цепи	мРНК N-формилметионил-тРНК Инициирующий кодон в мРНК (AUG) 30S-рибосомная субчастица 50S-рибосомная субчастица GTP Mg^{2+} Факторы инициации (IF-1, IF-2, IF-3)
3. Элонгация	Функциональная 70S-рибосома (инициирующий комплекс) Аминоацил-тРНК, соответствующие кодонам мРНК Mg^{2+} Факторы элонгации (Tu, Ts и G) GTP Пептидилтрансфераза
4. Терминация	ATP Терминирующий кодон в мРНК Факторы освобождения полипептида (R_1, R_2 и S)
5. Сворачивание и процессинг	Специфические ферменты и кофакторы, удаляющие инициирующие остатки и сигнальные последовательности, модифицирующие концевые остатки, присоединяющие к ферментам простетические группы, осуществляющие ковалентную модификацию R-групп определенных аминокислот за счет присоединения фосфатных, метильных, карбоксильных или углеводных остатков

а. Этап 1: активация аминокислот

На этом этапе, который протекает не в рибосоме, а в цитозоле, каждая из 20 аминокислот ковалентно присоединяется к определенной тРНК, используя для этого энергию ATP. Эти реакции катализируются группой требующих присутствия ионов Mg^{2+} активирующих ферментов, каждый из которых является специфическим по отношению к одной из аминокислот и к соответствующей этой аминокислоте тРНК.

б. Этап 2: инициация полипептидной цепи

На этом этапе мРНК, содержащая информацию о данном полипептиде, связывается с малой субчастицей рибосомы, а затем и с инициирующей аминокислотой, прикрепленной к соответствующей тРНК; в результате образуется *инициирующий комплекс*. тРНК, несущая инициирующую аминокислоту, взаимодействует по принципу комплементарности с находящимся в составе мРНК особым триплетом, или кодоном, который сигнализирует о начале полипептидной цепи.

Осуществлению этого процесса, который требует участия гуанозинтрифосфата (GTP), способствуют три специфических белка, присутствующие в цитозоле и называемые *факторами инициации.*

в. Этап 3: элонгация

Далее полипептидная цепь удлиняется за счет последовательного ковалентного присоединения аминокислот, каждая из которых доставляется к рибосоме и встраивается в определенное положение с помощью соответствующей тРНК, образующей комплементарные пары с отвечающим ей кодоном в мРНК. Элонгация осуществляется при помощи белков цитозоля, называемых *факторами элонгации.* Для связывания каждой поступающей аминоацил-тРНК и для перемещения рибосомы вдоль мРНК на один кодон, т. е. для удлинения растущего полипептида на одно звено, затрачивается энергия, получаемая при гидролизе двух молекул GTP.

г. Этап 4: терминация и высвобождение

После завершения синтеза полипептидной цепи, о котором сигнализирует *терминирующий кодон* мРНК, происходит высвобождение полипептида из рибосомы при участии особых «рилизинг»-факторов (от англ. release – высвобождать), или факторов терминации.

д. Этап 5: сворачивание полипептидной цепи и процессинг

Чтобы принять свою нативную биологически активную форму (разд. 8.1), полипептид должен свернуться, образуя при этом определенную пространственную конфигурацию. До или после сворачивания новосинтезированный полипептид может претерпевать процессинг, осуществляемый ферментами и заключающийся в удалении инициирующих аминокислот, в отщеплении лишних аминокислотных остатков, во введении в определенные аминокислотные остатки фосфатных, метильных, карбоксильных и других групп, а также в присоединении олигосахаридов или простетических групп.

Рассмотрим теперь более подробно каждый из этих этапов.

29.3. Для активации аминокислот необходимы тРНК

Для того чтобы понять, каким образом тРНК выполняют роль адапторов при переводе с языка нуклеиновых кислот на язык белков, нам следует сначала познакомиться с их структурой. тРНК представляют собой сравнительно небольшие одноцепочечные молекулы. тРНК бактерий и внемитохондриального цитозоля эукариот состоят из 73–93 нуклеотидов, что соответствует мол. массе 24 000–31 000. (Митохондрии содержат особые тРНК несколько меньшего размера.) Каждой аминокислоте соответствует хотя бы одна тРНК; некоторым аминокислотам соответствуют две или большее число специфических тРНК. Чтобы распознать все аминокислотные кодоны, требуется по меньшей мере 32 тРНК (разд. 29.20), однако в некоторых клетках присутствует намного больше разных вариантов тРНК.

Многие тРНК выделены в гомогенном виде. В 1965 г. после нескольких лет работы Роберт У. Холли и его сотрудники из Корнелльского университета установили полную нуклеотидную последовательность аланиновой тРНК дрожжей. Эта тРНК, ставшая самой первой нуклеиновой кислотой, которую удалось полностью секвенировать, содержит 76 нуклеотидных остатков, в том числе 10 модифицированных. Ее полная нуклеотидная последовательность приведена на рис. 29-3. С тех пор была установлена нуклеотидная последовательность для десятков других тРНК, выделенных из разных видов организмов и обладающих разной аминокислотной специфичностью; при их сравнении удалось выявить много общих черт, характерных для структуры тРНК. Во всех тРНК 8 или больше нуклеотидов содержат необычные, модифицированные основания, многие из которых представляют собой метилированные производные главных

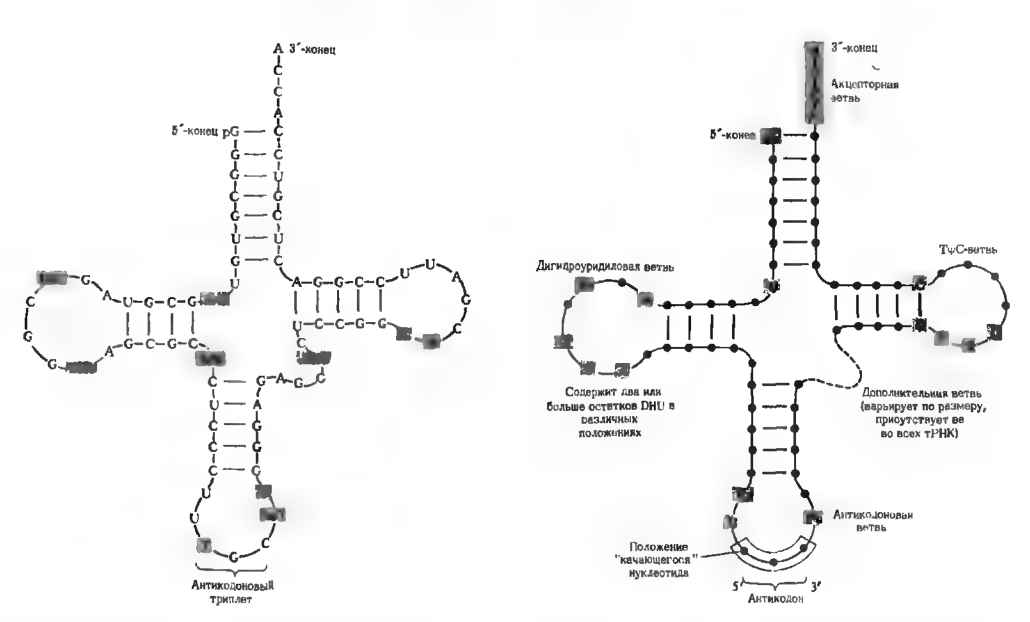


Рис. 29-3. Нуклеотидная последовательность дрожжевой аланиновой тРНК, определенная Холли и его сотрудниками и изображенная в форме клеверного листа. В дополнение к A, G, U и C использованы следующие символы для модифицированных нуклеозидов: ψ – псевдоуридин, I – инозин, T – риботимидин, DHU – 5,6-дигидроуридин, m^1I – 1-метилинозин, m^1G – 1-метилгуанозин, m^2G – N^2-диметилгуанозин. Модифицированные нуклеозиды даны на красном фоне. Красные линии между параллельными участками молекулы обозначают комплементарные пары оснований. Антикодон обладает способностью «узнавать» аланиновые кодоны в мРНК. Другие особенности структуры тРНК отмечены в тексте и на рис. 29-4. В РНК G может образовывать пары и с C, и с U, хотя пара G–U не так стабильна, как уотсон-криковская пара G–C.

Рис. 29-4. Обобщенная вторичная структура, характерная для всех тРНК. Если изобразить структурные формулы тРНК с учетом принципа образования максимального числа внутримолекулярных пар, то для всех тРНК они принимают форму клеверного листа. Черные кружки на остове молекулы обозначают нуклеозидные остатки, а красные линии проведены между комплементарными основаниями. Положения, занимаемые во всех тРНК одними и теми же основаниями, выделены красным фоном. Размеры тРНК варьируют от 73 до 93 нуклеотидов. Добавочные нуклеотиды встречаются в дополнительной и дигидроуридиловой ветвях. На вершине антикодоновой ветви расположена антикодоновая петля, которая всегда содержит семь неспаренных нуклеотидов. В состав дигидроуридиловой ветви обычно входит до трех остатков DHU.
В некоторых тРНК дигидроуридиловая ветвь состоит всего из трех пар оснований, соединенных водородными связями. Обозначения: Pu пуриновый нуклеозид, Py – пиримидиновый нуклеозид, ψ – псевдоуридин, G* – гуанозин или 2′-O-метилгуанозин, T – риботимидин, DHU – дигидроуридин.

оснований. В большинстве тРНК на 5′-конце находится остаток гуаниловой кислоты (pG), а на 3′-конце всех тРНК присутствует тринуклеотидная последовательность —C—C—A (3′). Если изобразить структурную формулу тРНК в таком виде, чтобы число внутримолекулярных комплементарных пар (т. е. A—U, G—C и G—U) было максимальным, то такая формула будет иметь вид «клеверного листа». В «клеверном листе» различают четыре ветви; более длинные тРНК содержат, кроме того, короткую пятую, или дополнительную, ветвь (рис. 29-3 и 29-4). Две из этих ветвей непосредственно участвуют в функционировании тРНК в качестве адаптора. *Акцепторная ветвь* присоединяет специфическую аминокислоту (АК), карбоксильная группа которой эфирной связью прикрепляется к 2′- или 3′-гидроксильной группе 3′-концевого остатка A в тРНК. *Антикодоновая ветвь* содержит *антикодон*, т. е. специфический триплет нуклеотидов, который комплементарен в антипараллельном направлении со-

Псевдоуридин Инозин Дигидроуридин 1-метилгуанозин

Рис. 29-5. Некоторые из необычных или модифицированных нуклеозидов, обнаруженных в тРНК.

ответствующему триплету (кодону) мРНК и может образовывать с ним пары оснований.

Каждая тРНК имеет свой особый антикодон. Две ее другие главные ветви – *дигидроуридиловая ветвь*, которая содержит необычный нуклеозид дигидроуридин, и ТΨС-ветвь; в последней находятся нуклеозид риботимидин (Т), как правило, не присутствующий в РНК, и нуклеозид псевдоуридин (Ψ), в котором основание и пентоза соединены необычной углерод-углеродной связью (рис. 29-5).

Дрожжевая фенилаланиновая тРНК была получена в кристаллическом виде и подвергнута рентгеноструктурному анализу, который подтвердил, что в тРНК соблюдается принцип максимального внутримолекулярного спаривания оснований при помощи водородных связей. Однако трехмерная структура тРНК напоминает скорее перевернутую латинскую букву L, нежели клеверный лист (рис. 29-6). В дополнение к водородным связям между парами оснований в поддержании третичной структуры тРНК принимают участие и водородные связи другого рода. Поскольку спаривание оснований в РНК осуществляется не столь строго, как в ДНК, спаренным участкам тРНК не свойственна строгая регулярность, поэтому структура тРНК в отличие от двойной спирали ДНК не имеет формы жесткой палки и характеризуется значительной гибкостью.

Рассмотрим теперь, как к молекуле

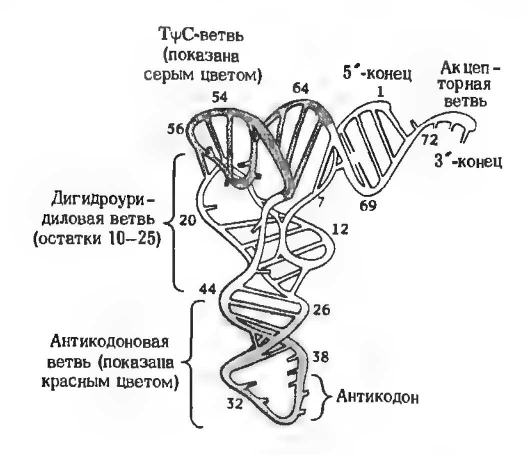


Рис. 29-6. Трехмерная структура дрожжевой фенилаланиновой тРНК, установленная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 3 Å. Она напоминает перевернутую латинскую букву L.
[Из работы Кима и др., Science, 185, 436 (1974).]

тРНК с помощью фермента присоединяется специфическая аминокислота.

29.4. Аминоацил-тРНК – синтетазы присоединяют к тРНК соответствующую ей аминокислоту

На первом этапе биосинтеза белка, протекающем в цитозоле клетки, двадцать различных аминокислот присоединяются эфирной связью к соответствующим тРНК. Эти процессы катализируются двадцатью различными активирующими ферментами, называемыми аминоацил-тРНК – синтетазами, каждый из которых специфичен по отношению к какой-то одной аминокислоте и к соответствующей тРНК. Почти все аминоацил-тРНК – синтетазы *E. coli* были выделены в чистом виде и многие из них были по-

лучены в кристаллическом виде. Общий вид катализируемой ими реакции может быть выражен уравнением

$$\text{Аминокислота} + \text{тРНК} + \text{ATP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftarrows}$$
$$\overset{Mg^{2+}}{\rightleftarrows} \text{Аминоацил-тРНК} + \text{AMP} + PP_i$$

Процесс активации аминокислот состоит из двух отдельных стадий, осуществляемых в каталитическом центре фермента. На первой стадии в активном центре фермента в результате взаимодействия ATP и аминокислоты образуется связанное с ферментом промежуточное соединение – аминоациладенилат (рис. 29-7). В ходе реакции карбоксильная группа аминокислоты соединяется ангидридной связью с 5′-фосфатной группой AMP, вытесняя при этом пирофосфат:

$$\text{Аминокислота} + \text{ATP} + \text{E} \rightleftarrows$$
$$\rightleftarrows \text{E} - [\text{Аминоациладенилат}] + PP_i$$

На второй стадии аминоацильный остаток переносится с аминоациладенилата, связанного с ферментом, на соответствующую специфическую тРНК:

$$\text{E} - [\text{Аминоациладенилат}] + \text{тРНК} \rightleftarrows$$
$$\rightleftarrows \text{Аминоацил-тРНК} + \text{Аденилат} + \text{E}$$

На этой последней стадии аминоацильный остаток связывается со свободной 2′- или 3′-гидроксильной группой концевого остатка A в молекуле тРНК (рис. 29-8); однако, присоединившись к одной из них, он может свободно «перепрыгивать» на другую гидроксильную группу и обратно. Эфирная связь между аминокислотой и тРНК является высокоэнергетической; величина $\Delta G^{0\prime}$ ее гидролиза составляет приблизительно – 7 ккал/мол. Образующийся в процессе активации неорганический пирофосфат гидролизуется *пирофосфатазой* до ортофосфата (разд. 14.17). Таким образом, на активацию каждой аминокислоты затрачиваются в конечном счете две высокоэнергетические фосфатные связи, что делает суммарную реакцию активации аминокислоты практически необратимой:

$$\text{Аминокислота} + \text{тРНК} + \text{ATP} \overset{Mg^{2+}}{\rightarrow}$$
$$\overset{Mg^{2+}}{\rightarrow} \text{Аминоацил-тРНК} + \text{AMP} + 2P_i$$
$$\Delta G = -7{,}0 \text{ ккал/мол}$$

Аминоацил-тРНК – синтетазы очень специфичны в отношении как тРНК, так и соответствующей ей аминокислоты. Если к тРНК присоединится неправильная аминокислота и образуется ошибочная аминоацил-тРНК, то неправильный аминокислотный остаток включится в полипептидную цепь. Однако некоторые аминоацил-тРНК – синтетазы – это «хитрые» ферменты; подобно ДНК-полимеразам, они способны находить

Аминоацильная группа

Аденин

Рис. 29-7. Обобщенная структура аминоациладенилата, образующегося в активном центре аминоацил-тРНК – синтетаз.

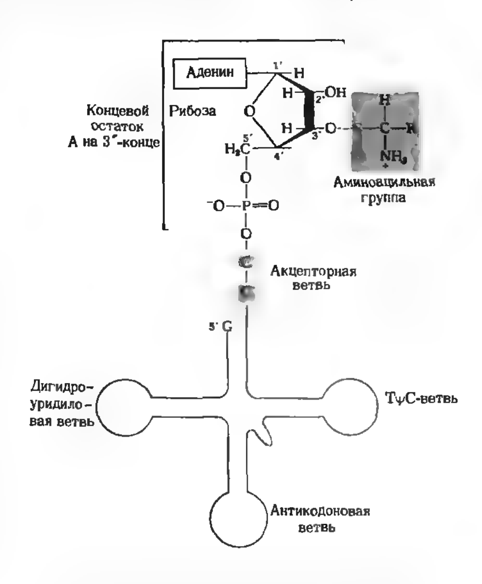


Рис. 29-8. Обобщенная структура аминоацил-тРНК. Аминоацильная группа, присоединенная в 3′-положении к концевому остатку A (аденилата), показана на красном фоне. R означает боковую группу аминокислоты. Аминоацильная группа может перемещаться из 2′-положения рибозы в 3′-положение и обратно.

и исправлять свои собственные ошибки. Например, из-за того, что R-группы аминокислот валина и изолейцина структурно очень похожи друг на друга (единственное различие состоит в том, что R-группа в изолейцине содержит на одну —CH_2-группу больше), можно было бы ожидать, что на место изолейцина в полипептидную цепь будет часто встраиваться валин. Однако оказывается, что частота ошибок при включении изолейцина не больше, чем в случае других аминокислот,– около одной на 3000–4000 остатков; это объясняется тем, что изолейцил-тРНК – синтетаза способна находить и предотвращать такие ошибки. Она распознает образованный неправильный аминоациладенилат и исправляет ошибку, гидролизуя валил-AMP, когда тот находится еще в активном центре:

$$\text{E} - [\text{Валил-AMP}] + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Валин} + \text{AMP} + \text{E}$$

Затем изолейцил-тРНК – синтетаза начинает все сначала и образует правильный интермедиат изолейцил-AMP, который в свою очередь превращается в правильную изолейцил-$тРНК^{Ile}$:

$$\text{Изолейцин} + \text{ATP} \rightleftarrows \text{Изолейцил-AMP} +$$
$$+ PP_i$$
$$\text{E} - [\text{Изолейцил-AMP}] + тРНК^{Ile} \rightleftarrows$$
$$\rightleftarrows \text{Изолейцил-}тРНК^{Ile} + \text{AMP} \quad + \text{E}$$

Поскольку R-группа у валина чуть меньше, чем у изолейцина, создается впечатление, что валил-AMP соответствует гидролитическому участку изолейцил-тРНК – синтетазы, а изолейцил-AMP не соответствует. По-видимому, у аминоацил-тРНК – синтетаз есть четыре специфических участка, которые участвуют в узнавании, катализе и исправлении ошибок: один для аминокислоты, второй для тРНК, третий для ATP и четвертый для H_2O, необходимой для гидролиза неправильных аминоациладенилатов.

29.5. тРНК играет роль адаптора

После присоединения к соответствующей тРНК аминокислота уже не участвует в определении специфичности аминоацил-тРНК, ибо сама по себе аминоацильная группа не узнается ни рибосомой, ни мРНК. Специфичность аминоацил-тРНК обеспечивается исключительно структурой тРНК. Это было окончательно доказано четкими опытами, в которых с помощью ферментов была получена цистеинил-$тРНК^{Cys}$, которую затем выделили и химическим путем превратили в аланил-$тРНК^{Cys}$. После этого такую гибридную аминоацил-тРНК, которая несет аланин, но содержит антикодон для цистеина, инкубировали в бесклеточной белоксинтезирующей системе. При анализе новосинтезированного полипептида было обнаружено, что в положениях, которые должен занимать цистеин, присутствует аланин. Таким образом, этот эксперимент подтвердил адапторную гипотезу Крика.

29.6. Синтез полипептидной цепи начинается с N-конца

Возникает еще один вопрос. С какого конца начинается рост полипептидной цепи – с N- или С-конца? Ответ был получен в результате экспериментов с использованием изотопной метки. Ретикулоциты, т.е. незрелые красные кровяные клетки, которые активно синтезируют гемоглобин, инкубировали с радиоактивным лейцином. Эта аминокислота была выбрана потому, что она часто встречается как в α-, так и в β-цепях глобина. Через различные промежутки времени после добавления радиоактивного лейцина из ретикулоцитов выделяли синтезированные α-цепи и определяли распределение в них радиоактивности. В глобиновых цепях, выделенных после 60-минутной инкубации, радиоактивными оказались почти все остатки лейцина; если же синтезированные цепи выделяли из клеток через несколько минут после добавления радиоактивного лейцина, то радиоактивность обнаруживалась лишь

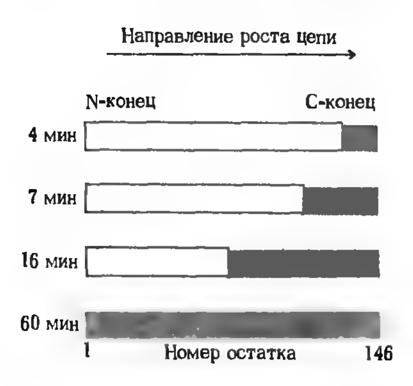


Рис. 29-9. Доказательство того, что полипептидные цепи растут за счет присоединения новых аминокислотных остатков к С-концу. Красным цветом отмечены те части цепей гемоглобина, которые содержат остатки радиоактивного лейцина через разные промежутки времени после добавления его в инкубационную смесь. Через 4 мин оказались мечеными лишь несколько остатков на С-конце α-глобина. При более длительной инкубации с меченым лейцином мечеными становятся все большие и большие участки полипептидной цепи, причем меченые остатки лейцина всегда обнаруживаются в прилежащей к С-концу части цепи. Следовательно, полипептидные цепи растут в результате последовательного присоединения аминокислот к С-концу.

в С-концевой части полипептида (рис. 29-9). Из этих наблюдений был сделан вывод, что синтез полипептидных цепей начинается с N-конца, к которому один за другим присоединяются аминокислотные остатки, и полипептидная цепь растет в направлении к С-концу.

Посмотрим теперь, как инициируется биосинтез полипептидов.

29.7. Инициирующей аминокислотой у прокариот служит N-формилметионин, а у эукариот – метионин

У *E. coli* и у всех других прокариот начальным, N-концевым аминокислотным остатком всегда оказывается остаток *N-формилметионина* (рис. 29-10). В процесс биосинтеза белка он вступает в составе N-формилметионил-тРНК (обозначаемой как фМет-тРНК^{fMet}), которая образуется в результате двух последовательных реакций. Сначала метионин присоединяется с помощью метионил-тРНК – синтетазы к особой инициирующей метиониновой тРНК – тРНК^{fMet}:

$$\text{Метионин} + \text{тРНК}^{fMet} + \text{ATP} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Метионил-тРНК}^{fMet} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Во второй реакции формильная группа при помощи специфической трансформилазы переносится от донора *N-формилтетрагидрофолата* (разд. 10.10) к аминогруппе метионинового остатка:

$$N^{10}\text{-формилтетрагидрофолат} +$$
$$+ \text{Мет-тРНК}^{fMet} \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{Тетрагидрофолат} + \text{фМет-тРНК}^{fMet}$$

```
        H  COO⁻
        |  |
  H—C—N—C—H
    ‖      |
    O      CH2
           |
           CH2
           |
           S
           |
           CH3
```

Рис. 29-10. N-формилметионин – инициирующая аминокислота у всех прокариот. N-формильная группа показана красным цветом.

Трансформилаза не способна формилировать свободный метионин. Существуют два вида тРНК, специфичных к метионину, – тРНК^{Met} и тРНК^{fMet}. Обе эти тРНК могут присоединять метионин в реакции активации, но приобретать формильную группу и становиться инициирующей аминокислотой метионин способен только в составе метионил-тРНК^{fMet}. Другая тРНК – метионил-тРНК используется для встраивания метионина во *внутренние* участки полипептидной цепи. Блокирование аминогруппы метионина N-формильным остатком препятствует включению такой аминокислоты во внутренние участки цепи, но в то же время позволяет фМет-тРНК^{fMet} связываться с особым местом инициации на рибосоме, с которым не может связываться ни Мет-тРНК^{Met}, ни любая другая аминоацил-тРНК.

Что касается эукариотических клеток, то все полипептиды, синтезируемые их внемитохондриальными рибосомами,

начинаются с остатка метионина, который поступает туда в составе специальной инициирующей метионил-тРНК. Полипептиды же, синтезируемые в митохондриях и хлоропластах эукариотических клеток так же, как и в бактериях, начинаются с N-формилметионина. Это и другие похожие свойства белоксинтезирующих аппаратов митохондрий и хлоропластов, с одной стороны, и бактерий – с другой, служат подтверждением точки зрения (разд. 2.8 и 17.18), согласно которой митохондрии и хлоропласты произошли от бактерий на ранних этапах эволюции эукариотических клеток. Следует, однако, отметить, что в некоторых других отношениях между механизмами транскрипции и трансляции у бактерий и митохондрий имеются значительные различия.

У нас осталась без ответа еще одна загадка. Поскольку для метионина известен только один кодон, а именно (5')AUG(3'), возникает вопрос: каким образом этот единственный кодон используется для встраивания и начального N-формилметионинового остатка (или метионинового, в случае эукариот), и тех метиониновых остатков, которые предназначены для включения во внутренние участки полипептидных цепей? Ответ на этот вопрос будет дан позже, после рассмотрения этапа инициации белкового синтеза, а пока необходимо остановиться на структуре рибосом.

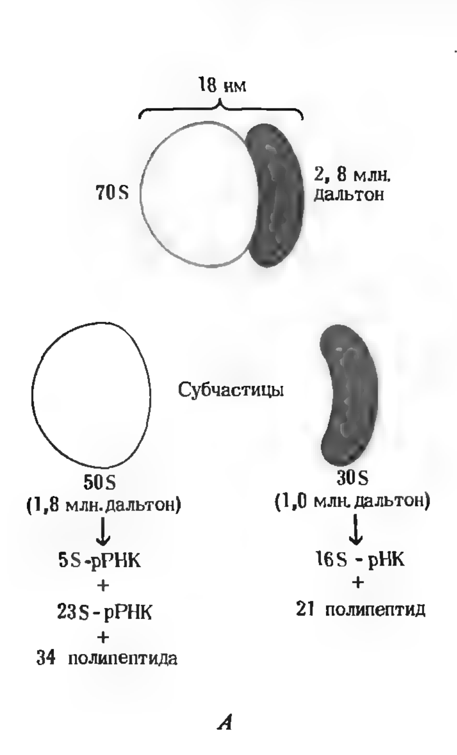
29.8. Рибосомы – это молекулярные машины, предназначенные для синтеза полипептидных цепей

В каждой клетке *E. coli* имеется больше 15 000 рибосом, которые составляют почти четверть сухого веса клетки. Прокариотические рибосомы содержат приблизительно 65% рРНК и около 35% белка. Вес рибосомной частицы $\sim 2{,}8 \cdot 10^6$ дальтон, диаметр ~ 18 нм, коэффициент седиментации 70S.

Прокариотические рибосомы состоят из двух субчастиц неравного размера (рис. 29-11) – большой с коэффициентом седиментации 50S и малой с коэффициентом седиментации 30S; вес большой субчастицы $1{,}8 \cdot 10^6$ дальтон, а малой $1{,}0 \cdot 10^6$ дальтон. В состав 50S-субчастицы входят одна молекула 23S-рРНК (~ 3200 нуклеотидов), одна молекула 5S-рРНК (~ 120 нуклеотидов) и 34 белка. Субчастица 30S содержит одну молекулу 16S-рРНК (1600 нуклеотидов) и 21 белок. Белки субчастиц обозначаются номерами: в большой (50S) субчастице от L1 до L34 (L от англ. Large – большая) и в малой (30S) субчастице от S1 до S21 (S от англ. Small – малая). Все белки рибосом *E. coli* выделены и многие из них секвенированы; они заметно отличаются друг от друга. Их молекулярные массы лежат в пределах от 6000 до 75 000.

Нуклеотидные последовательности одноцепочечных рРНК *E. coli* также установлены. Каждая из трех рРНК обладает специфической трехмерной структурой, обусловленной характером внутримолекулярного спаривания оснований. На рис. 29-12 показана предполагаемая конформация 5S-рРНК, соответствующая максимальному числу спаренных оснований. рРНК, по-видимому, выполняют роль каркасов, на которых в строго определенном порядке крепятся полипептидные компоненты. Если 21 полипептид и 16S-рРНК 30S-субчастицы выделить в чистом виде, а затем смешать в соответствующей последовательности при правильной температуре, то макромолекулы самопроизвольно образуют 30S-субчастицы, идентичные по структуре и активности нативным. Аналогичным образом, 50S-субчастица может быть самопроизвольно реконструирована из своих 34 полипептидов и своих 5S- и 16S-рРНК при условии, что в смеси присутствует также 30S-субчастица. Вероятно, каждый из 55 белков прокариотической рибосомы играет специфическую роль в синтезе полипептидов, выполняя функцию либо фермента, либо «помошника» в общем процессе. Однако в настоящее время эти специфические функции установлены только для нескольких рибосомных белков.

Хотя обычно рибосомы изображают в виде симметричной фигуры, в которой 30S-субчастица наподобие шапочки ле-



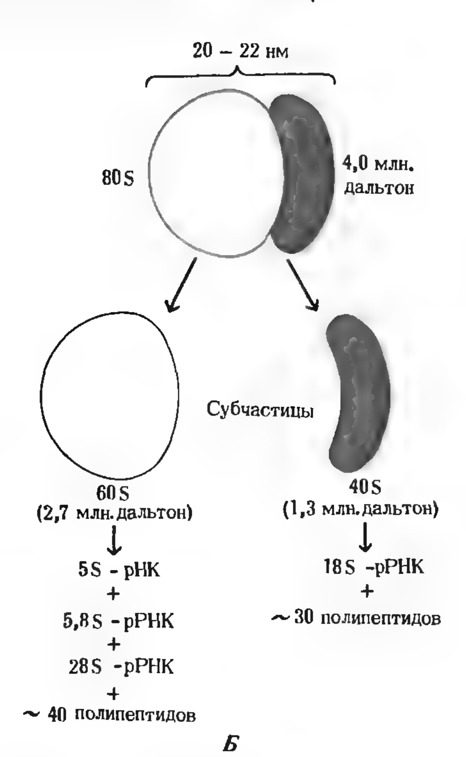
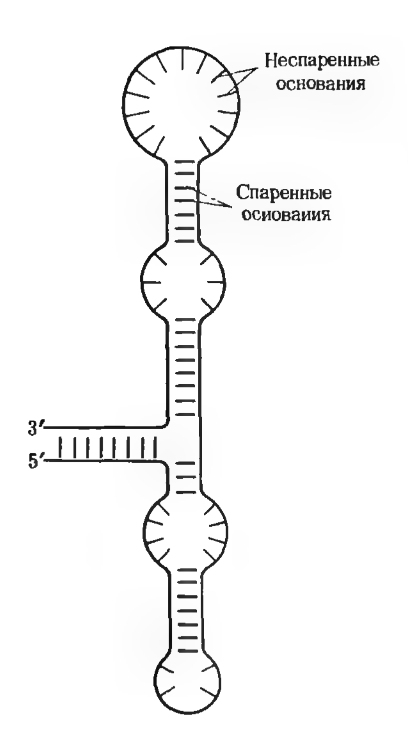


Рис. 29-11. Состав прокариотических (*А*) и эукариотических (*Б*) рибосом (цитоплазматических). Рибосомы митохондрий и хлоропластов эукариот напоминают рибосомы прокариотических клеток.



жит на 50S-субчастице, имеющей форму, близкую к сфере (как это показано на рис. 29-11), в действительности эти субчастицы расположены не симметрично и имеют совершенно неправильную форму. На рис. 29-13 показана трехмерная структура 30S- и 50S-субчастиц рибосомы *E. coli*, построенная на основе данных рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии. Две замысловатой формы субчастицы пригнаны друг к другу, причем между ними остается щель. Через эту щель проходит молекула мРНК, вдоль которой в процессе трансляции перемещается рибосома. Из этой щели появляется новосинтезированная полипептидная цепь.

Рис. 29-12. Схематическое изображение одной из возможных моделей вторичой структуры 5S-рРНК прокариот, соответствующей максимальному числу внутримолекулярных пар оснований (они указаны красными черточками).

29.9. Цитоплазматические рибосомы эукариот имеют более крупные размеры и более сложно устроены

Внемитохондриальные рибосомы эукариотических клеток существенно крупнее прокариотических рибосом (рис. 29-11). Их диаметр равен приблизительно 21 нм, коэффициент седиментации 80S, а вес достигает $4 \cdot 10^6$ дальтон. Они так же, как и прокариотические рибосомы, состоят из двух субчастиц, размер которых варьирует у разных видов, но в среднем равен 60S и 40S. Малая субчастица содержит 18S-рРНК, а в состав большой субчастицы входят 5S-, 5,8S- и 28S-рРНК. Всего эукариотические рибосомы содержат свыше 70 различных белков. рРНК и большинство белков эукариотических рибосом также выделены и охарактеризованы.

Две субчастицы рибосом соединены друг с другом не все время. Как мы увидим ниже, каждый раз, когда начинается синтез новой полипептидной цепи, рибосомы должны диссоциировать на субчастицы.

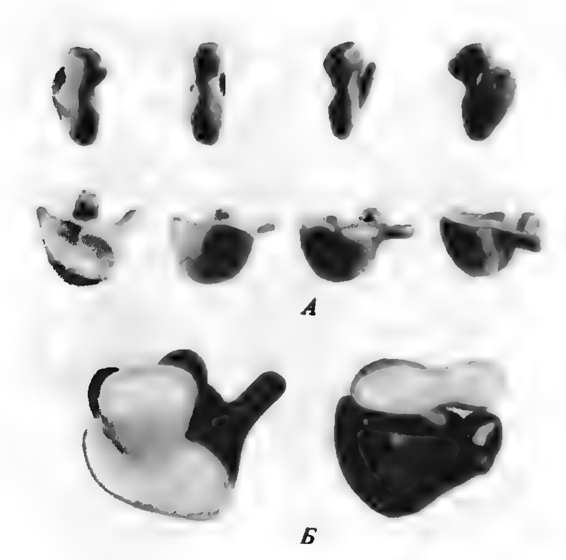


Рис. 29-13. Рибосомные субчастицы *E. coli* имеют замысловатую форму, выявленную с помощью рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии. *А*. Модели 30S- (вверху) и 50S- (внизу) субчастиц, показанные в разных ракурсах. *Б*. Собранная 70S-рибосома в двух ракурсах. 30S-субчастица – светлая, 50S-субчастица – темная.

29.10. Инициация синтеза полипептида происходит в несколько стадий

Для инициации полипептидной цепи в клетках прокариот необходимы: 1) 30S-субчастица, содержащая 16S-рРНК; 2) мРНК, кодирующая синтезируемый полипептид; 3) инициирующая N-формилметионил-тРНК^{fMet}; 4) три белка, называемые *факторами инициации* (IF-1, IF-2 и IF-3); 5) GTP (табл. 29-1).

Образование *инициирующего комплекса* протекает в три стадии. На первой из них 30S-рибосомная субчастица связывает фактор инициации 3 (IF-3), который препятствует объединению 30S- и 50S-субчастиц. Затем к 30S-субчастице присоединяется мРНК таким образом, что инициирующий кодон мРНК (5′) AUG (3′) связывается с определенным участком 30S-субчастицы (рис. 29-14). Правильное расположение инициирующего кодона AUG на 30S-субчастице обеспечивается с помощью особого *инициирующего сигнала*, представляющего собой участок мРНК, расположенный с 5′-стороны от кодона AUG. Этот сигнал состоит преимущественно из остатков A и G и включает обычно от 6 до 8 таких остатков. Он узнается комплементарной последовательностью 16S-рРНК 30S-субчастицы

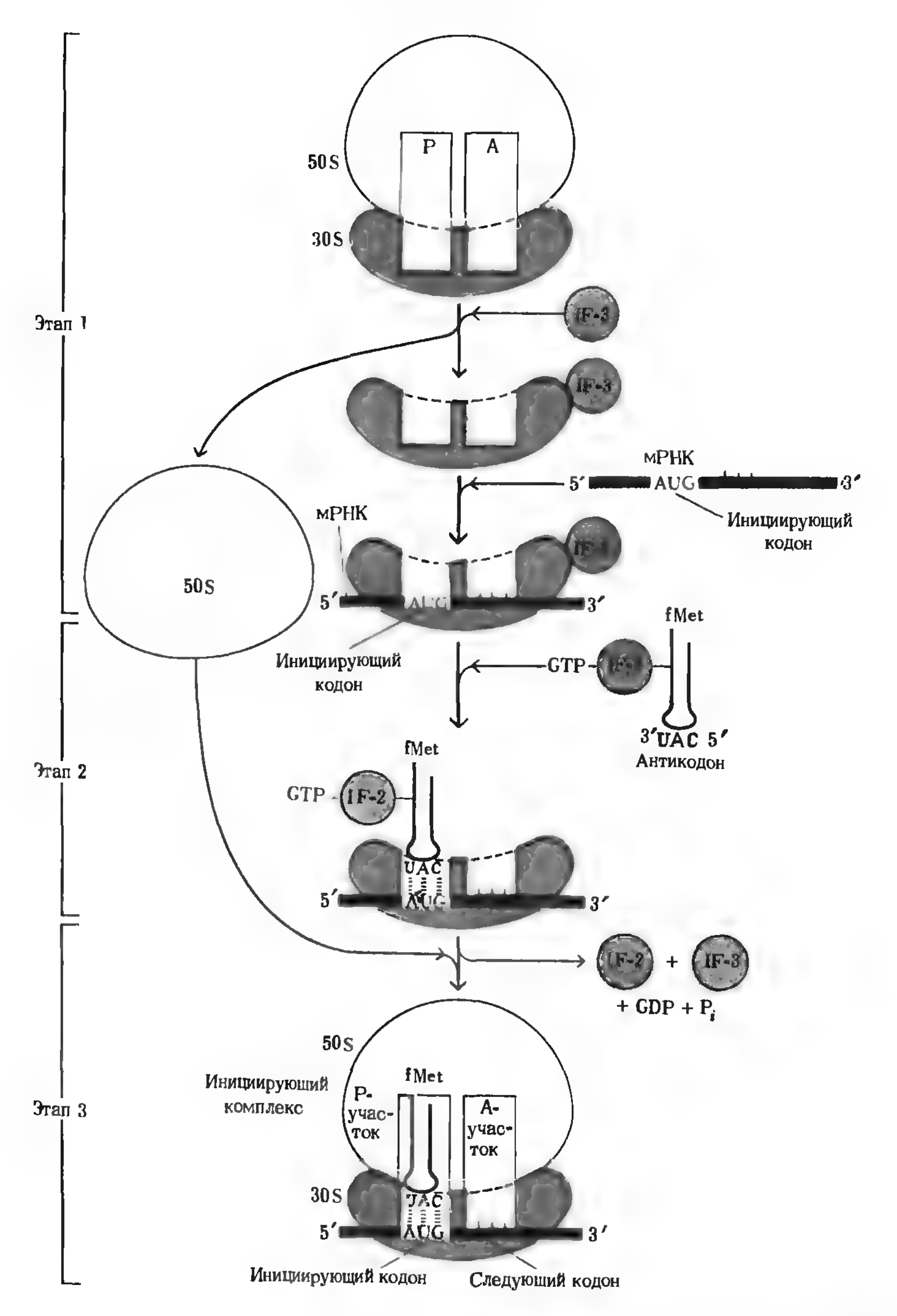


Рис. 29-14. Три стадии процесса образования инициирующего комплекса, протекающего за счет энергии гидролиза GTP до GDP и P_i. IF-1, IF-2 и IF-3 – факторы инициации. Буквами *P* и *A* обозначают соответственно пептидильный и аминоацильный участки рибосомы. Роль IF-1 до конца не выяснена.

и благодаря этому мРНК фиксируется в нужном для инициации трансляции положении. Поскольку и для инициирующих, и для внутренних остатков метионина существует всего лишь один кодон, инициирующий сигнал с 5'-стороны от AUG указывает место, с которым надлежит связаться фМет-тРНК^{fMet}. Внутренние кодоны AUG специфичны по отношению к Мет-тРНК^{Met} и не способны связывать фМет-тРНК^{fMet}.

На второй стадии процесса инициации (рис. 29-14) размер комплекса, состоящего из 30S-субчастицы, IF-3 и мРНК, увеличивается в результате соединения с фактором инициации IF-2, уже связанного с GTP и с инициирующей N-формилметионил-тРНК^{fMet}, которая попадает точно на инициирующий кодон.

На третьей стадии инициации этот большой комплекс взаимодействует с 50S-рибосомной субчастицей; одновременно молекула GTP, связанная с IF-2, гидролизуется до GDP и фосфата, которые высвобождаются из комплекса. Факторы инициации IF-3 и IF-2 также покидают рибосому. Теперь мы имеем функционально активную 70S-рибосому, которая называется *инициирующим комплексом*; она содержит мРНК и инициирующую N-формилметионил-тРНК^{fMet}. Правильное положение N-формилметионил - тРНК^{fMet} в полном 70S-инициирующем комплексе обеспечивается двумя точками узнавания и связывания. Во-первых, антикодоновый триплет инициирующей аминоацил-тРНК образует комплементарные пары с антипараллельно расположенным кодоновым триплетом AUG в мРНК. Во-вторых, инициирующая аминоацил-тРНК присоединяется к пептидильному Р-участку рибосомы. В рибосоме имеется два участка связывания аминоацил-тРНК: аминоацил-, или А-участок и пептидил-, или Р-участок. Оба они образованы благодаря специфическому сочетанию областей 30S- и 50S-субчастиц. Инициирующая фМет-тРНК может связываться только с Р-участком (рис. 29-14), однако это исключение: все остальные вновь поступающие аминоацил-тРНК присоединяются к А-участку, тогда как Р-участок – это такое место рибосомы, с которого уходят «пустые» (т.е. освободившиеся от аминокислот) тРНК и к которому оказывается прикрепленной растущая пептидил-тРНК.

Инициирующий комплекс теперь готов к процессу элонгации.

29.11. Элонгация полипептидной цепи – это повторяющийся процесс

Присоединение каждого аминокислотного остатка к растущей полипептидной цепи происходит в три стадии. Этот цикл повторяется столько раз, сколько остатков следует присоединить. Для осуществления элонгации необходимы: 1) описанный выше инициирующий комплекс; 2) следующая аминоацил-тРНК, соответствующая следующему триплету мРНК; 3) три растворимых белка цитозоля, называемых *факторами элонгации* – EF-Tu, EF-Ts и EF-G; 4) GTP. Факторы элонгации часто обозначают просто Tu, Ts и G.

На первой стадии цикла элонгации (рис. 29-15) сначала происходит связывание следующей аминоацил-тРНК с комплексом, состоящим из фактора элонгации Tu и молекулы GTP. Образующийся тройной комплекс аминоацил-тРНК – Tu – GTP соединяется с 70S-инициирующим комплексом. Одновременно происходит гидролиз GTP, и комплекс Tu – GDP покидает 70S-рибосому, после чего с помощью GTP и фактора Ts комплекс Tu – GDP восстанавливается до Tu – GTP.

Далее с А-участком рибосомы связывается новая аминоацил-тРНК. Это происходит за счет антипараллельного комплементарного взаимодействия между антикодоном новой аминоацил-тРНК и соответствующим кодоном матричной РНК (структуру различных кодонов и антикодонов мы рассмотрим позже). Однако кодон-антикодонового взаимодействия недостаточно, чтобы обеспечить связывание правильной аминоацил-тРНК. Точное соответствие последней кодону мРНК проверяется с помощью еще одного специфического контакта внутри А-участка между другой частью

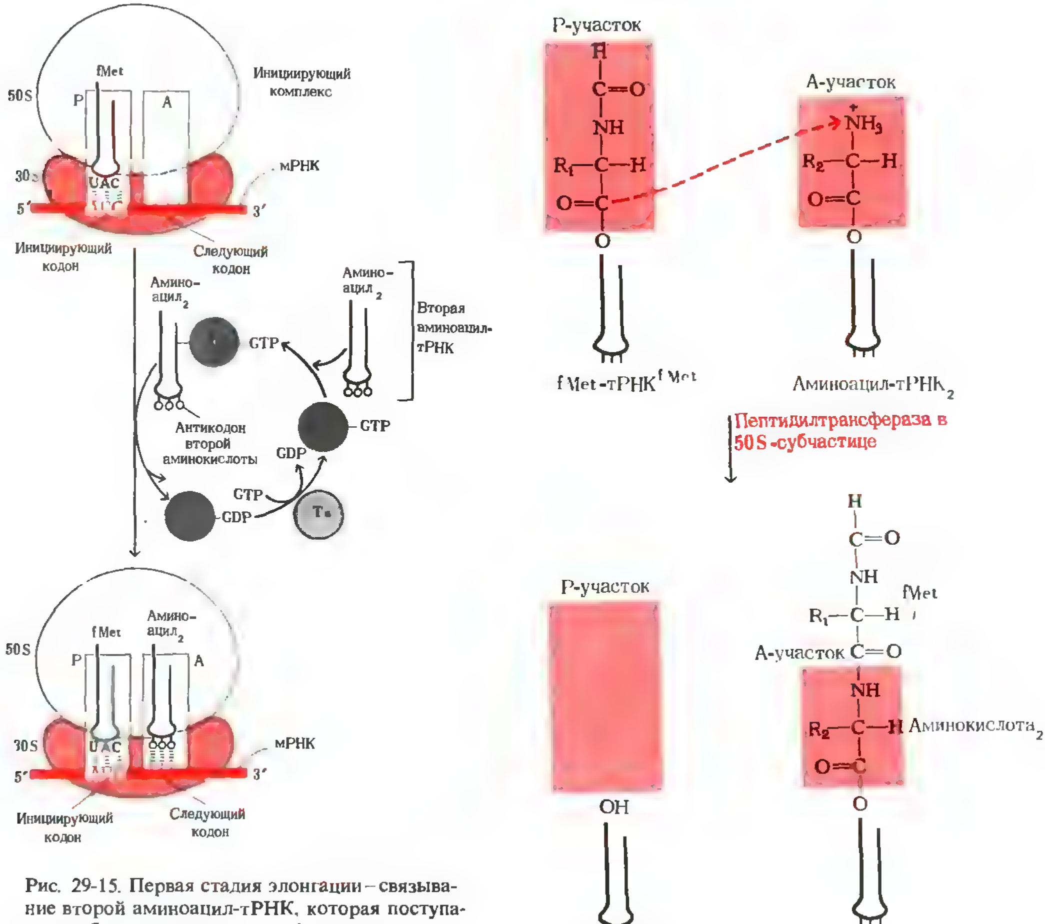


Рис. 29-15. Первая стадия элонгации – связывание второй аминоацил-тРНК, которая поступает в рибосому в комплексе с фактором элонгации Tu, содержащим связанный GTP. Присоединение второй аминоацил-тРНК сопровождается гидролизом связанного GTP. Образующийся при этом связанный GDP вновь превращается в GTP в ходе реакции, катализируемой фактором элонгации Ts. Нуклеотиды антикодона следующей аминокислоты обозначены кружками.

Рис. 29-16. Образование первой пептидной связи. N-формилметионильная группа переносится на аминогруппу второй аминоацил-тРНК; в результате в A-участке оказывается дипептидил-тРНК.

молекулы тРНК и рРНК. Следующая стадия элонгации наступает только в том случае, если оба контакта оказываются правильными.

На второй стадии цикла элонгации образуется новая пептидная связь между аминокислотами, чьи тРНК расположены в A- и P-участках рибосомы. Этот процесс осуществляется в результате переноса инициирующего N-формилметионинового остатка от несущей его тРНК к аминогруппе новой аминокислоты, которая только что попала в A-участок. Этот перенос катализируется *пептидилтрансферазой*, особым белком, входящим в состав 50S-субчастицы (рис. 29-16). В результате этой реакции в A-участке образуется дипептидил-тРНК, а в P-участке остается «пустая», ненагруженная инициирующая тРНК^{fMet}.

На третьей стадии цикла элонгации рибосома перемещается вдоль мРНК по направлению к ее 3′-концу на расстояние в один кодон (т.е. на три нуклеотида). Поскольку дипептидил-тРНК по-преж-

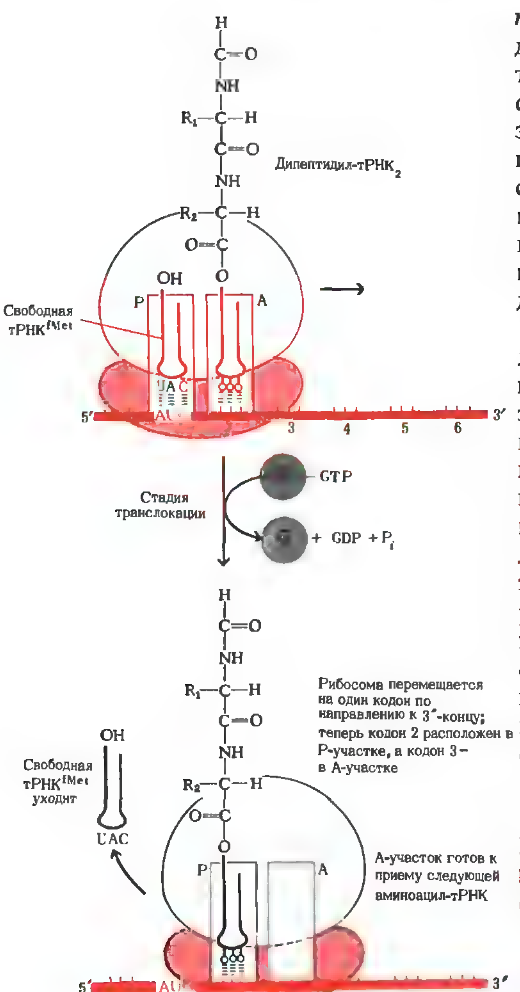


Рис. 29-17. Стадия транслокации. Рибосома передвигается на один кодон вперед в направлении 3′-конца мРНК за счет энергии, выделяющейся при гидролизе GTP, связанного с фактором элонгации G. Дипептидил-тРНК$_2$ перемещается в P-участок рибосомы, освобождая A-участок для следующей аминоацил-тРНК$_3$.

нему остается связанной со вторым кодоном мРНК, движение рибосомы приводит к перемещению дипептидил-тРНК из A-участка в P-участок, в результате чего предыдущая, уже свободная тРНК отделяется от P-участка и уходит обратно в цитозоль. Теперь в A-участке находится третий кодон мРНК, а второй кодон оказывается в P-участке. Передвижение рибосомы вдоль мРНК называется *транслокацией*; на этой стадии необходим фактор элонгации G (называемый также *транслоказой*) и гидролиз еще одной молекулы GTP (рис. 29-17). На этой стадии, вероятно, происходит изменение конформации всей рибосомы, способствующее передвижению ее по мРНК к следующему кодону в направлении к 3′-концу матрицы. Процесс транслокации обеспечивается энергией за счет гидролиза GTP.

Теперь рибосома вместе с прикрепленными к ней дипептидил-тРНК и мРНК готова к следующему циклу элонгации, т. е. к присоединению третьего аминокислотного остатка; осуществляется это точно так же, как присоединение второго остатка. На присоединение каждой аминокислоты затрачиваются две молекулы GTP, которые гидролизуются до GDP и P_i. По мере движения рибосомы от кодона к кодону вдоль мРНК к ее 3′-концу аминокислотные остатки один за другим добавляются к растущей полипептидной цепи, которая все это время остается связанной с тРНК, соответствующей последней включенной аминокислоте.

29.12. Для терминации синтеза полипептида необходим специальный сигнал

Наконец рибосома присоединила последнюю аминокислоту, полностью закончив синтез полипептида, кодируемого мРНК. О терминации полипептида сигнализирует один из трех терминирующих кодонов мРНК, расположенный непосредственно за кодоном последней аминокислоты. Терминирующие триплеты UAA, UAG и UGA не кодируют никакую аминокислоту. Их называют *бессмысленными триплетами* (нонсенс-триплетами). Первоначально они были обнаружены при исследовании изменения одного-единственного нуклеотида в некоторых кодонах, соответствующих определенным аминокислотам. Это изменение приводило к возникновению *нонсенс-мутантов E. coli*, для которых была характерна преждевременная терминация синтеза полипептидных цепей. С помощью таких нонсенс-мутантов, по-

лучивших название *amber*, *ochre* и *opal*, триплеты UAA, UAG и UGA были в конце концов идентифицированы как терминирующие кодоны.

Как только рибосома достигает терминирующего кодона, начинают действовать три терминирующих фактора (рилизинг-факторы) – белки R_1, R_2 и S. Они вызывают: 1) гидролитическое отщепление полипептида от конечной тРНК и его высвобождение; 2) отделение от Р-участка последней, теперь уже «пустой» тРНК; 3) диссоциацию 70S-рибосомы на 30S- и 50S-субчастицы, готовые к синтезу новой полипептидной цепи.

29.13. Для обеспечения точности белкового синтеза необходима энергия

Как мы уже видели (разд. 29.4), на ферментативное образование каждой аминоацил-тРНК из свободной аминокислоты затрачиваются две высокоэнергетические фосфатные группы. Для исправления ошибок, выявленных с помощью гидролитического действия аминоацил-тРНК – синтетазы, на этом этапе могут понадобиться добавочные молекулы АТР. Напомним, что одна молекула GTP расщепляется до GDP и фосфата на первой стадии элонгации и еще одна молекула GTP гидролизуется в процессе транслокации. Следовательно, в итоге для образования каждой пептидной связи необходимы по меньшей мере четыре высокоэнергетические связи. Это означает, что для поддержания процесса синтеза белка необходим большой термодинамический вклад, поскольку на образование пептидной связи затрачивается не менее $7{,}3 \cdot 4 = 29{,}2$ ккал энергии фосфатной группы, в то время как стандартная свободная энергия ее гидролиза составляет всего около $-5{,}0$ ккал. Таким образом, чистая затрата энергии на синтез пептидной связи составляет $-24{,}2$ ккал/мол. Хотя столь высокий расход энергии может показаться расточительным, он служит одним из важных факторов, обеспечивающим почти совершенную точность биологического перевода генетической информации мРНК на язык аминокислотной последовательности белков.

29.14. Полирибосомы позволяют быстро транслировать одну матрицу

Если из тканей, которые активно синтезируют белок, например из поджелудочной железы, осторожно выделить рибосомы, они часто оказываются собранными в группы, состоящие из нескольких или из многих рибосом, число которых иногда доходит до 80 и даже больше. Такие скопления, названные *полирибосомами*, или *полисомами*, были изучены с помощью электронного микроскопа и химическим путем. Под действием рибонуклеазы полирибосомы разобщаются на индивидуальные рибосомы. Это указывает на то, что они удерживаются с помощью цепи РНК. Действительно, цепь, соединяющую соседние рибосомы, можно увидеть на электронных микрофотографиях (рис. 29-18). Она является не чем иным, как мРНК, которая одновременно транслируется многими рибосомами, расположенными довольно близко друг к другу (рис. 29–18). Такая одновременная трансляция одной мРНК многими рибосомами значительно увеличивает эффективность использования матрицы.

Процессы транскрипции и трансляции в бактериях очень тесно сопряжены. Как показано на рис. 29-19, рибосомы могут начинать транслировать мРНК, когда та еще продолжает синтезироваться ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Другая особенность белкового синтеза в бактериях заключается в том, что время жизни молекул мРНК очень мало, всего несколько минут: они быстро разрушаются нуклеазами. По этой причине для того, чтобы синтез белка поддерживался на одном уровне, мРНК для данного белка или для группы белков должна синтезироваться постоянно и использоваться с максимальной эффективностью. Ниже мы увидим, что короткое время жизни мРНК у прокариот позволяет быстро выключать синтез белка, который больше не нужен.

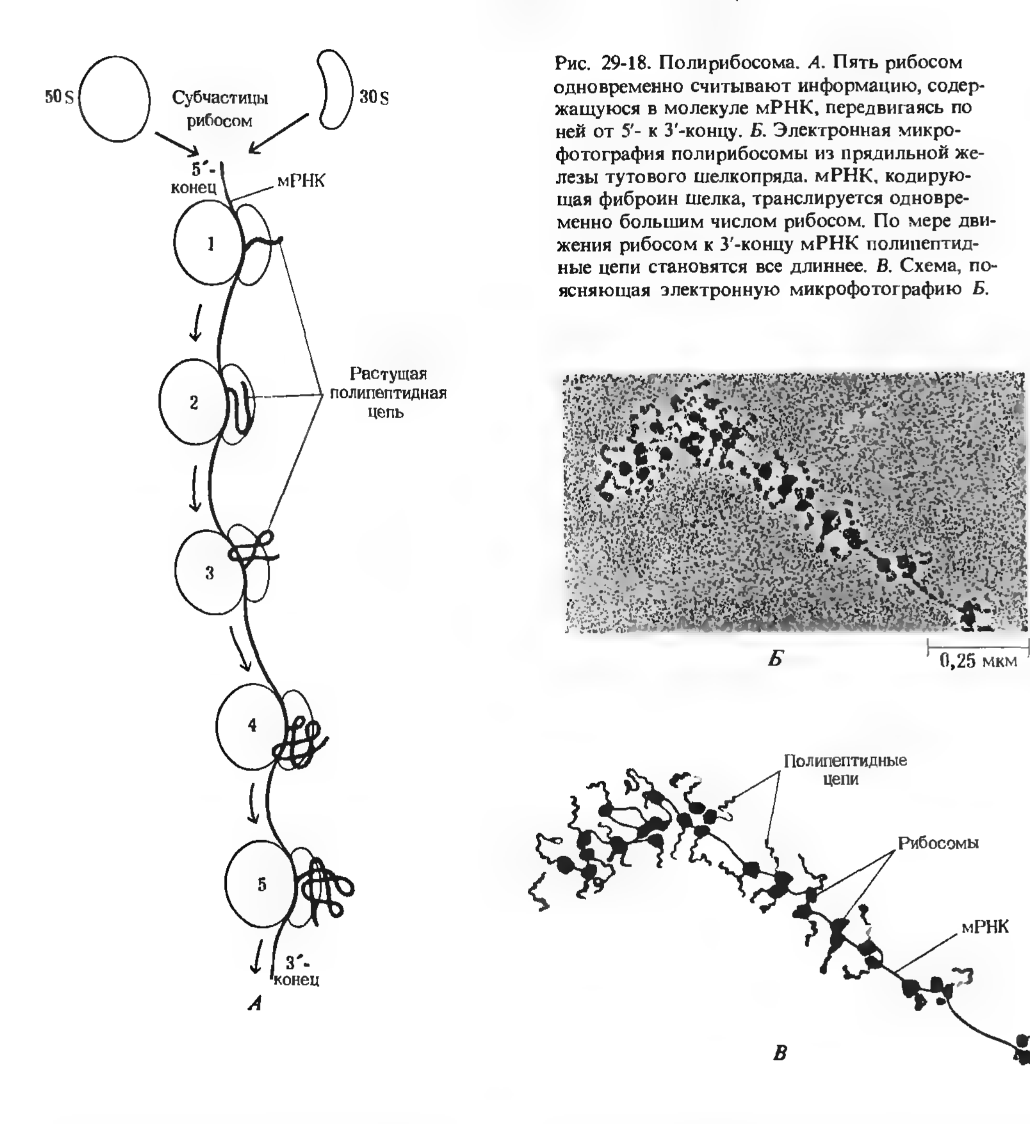


Рис. 29-18. Полирибосома. *А*. Пять рибосом одновременно считывают информацию, содержащуюся в молекуле мРНК, передвигаясь по ней от 5'- к 3'-концу. *Б*. Электронная микрофотография полирибосомы из прядильной железы тутового шелкопряда. мРНК, кодирующая фиброин шелка, транслируется одновременно большим числом рибосом. По мере движения рибосом к 3'-концу мРНК полипептидные цепи становятся все длиннее. *В*. Схема, поясняющая электронную микрофотографию *Б*.

29.15. Полипептидные цепи претерпевают сворачивание и процессинг

Как мы видели в гл. 7 и 8, белок остается биологически неактивным до тех пор, пока он не свернется с образованием присущей ему нативной конформации, которая определяется аминокислотной последовательностью. В какой-то момент – во время синтеза полипептидной цепи или после его завершения – белок самопроизвольно принимает свою нативную конформацию (разд. 8.6 и 8.7), т. е. линейная или одномерная генетическая информация, содержавшаяся в матричной РНК, преобразуется в специфическую трехмерную структуру новосинтезированного полипептида. Однако часто новообразованная полипептидная цепь не может принять окончательную биологически активную конформацию, пока она не подвергнется *процессингу или ковалентной модификации*. Изменения в ходе этих процессов получили название посттрансляционной модификации. У различных белков процессинг протекает по-разному.

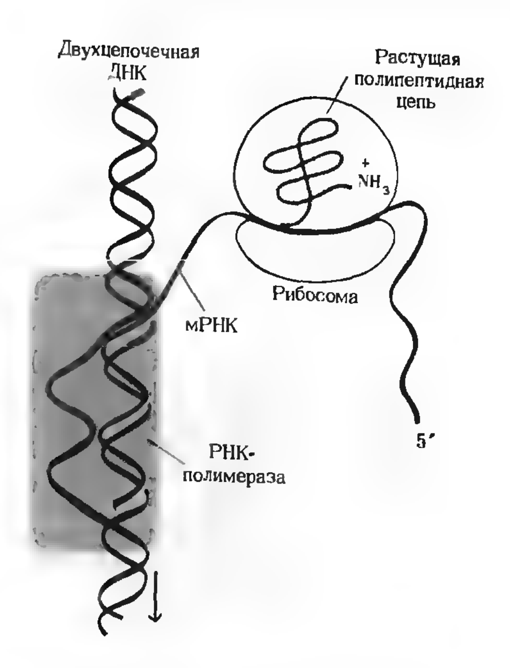


Рис. 29-19. Сопряжение процессов транскрипции и трансляции у бактерий. Еще до окончания транскрипции ДНК РНК-полимеразой образующаяся мРНК начинает транслироваться рибосомами. Это оказывается возможным благодаря тому, что в бактериях мРНК не надо транспортировать из ядра в цитоплазму.

а. Модификация N-конца и С-конца

В прокариотических клетках все полипептиды начинаются с остатка N-формилметионина, а в эукариотических – с остатка метионина (разд. 29.7). Однако формильная группа, инициирующий метионин, а часто и несколько следующих за ним аминокислотных остатков иногда удаляются с помощью особых ферментов и, таким образом, не обнаруживаются в окончательно сформированном белке.

В некоторых белках после трансляции ацетилируется аминогруппа N-концевого остатка, в других модификации подвергается С-концевой остаток.

б. Удаление сигнальных последовательностей

Как мы увидим ниже, некоторые белки содержат на N-конце дополнительную полипептидную последовательность из 15–30 остатков, которая направляет этот белок к месту его назначения в клетке. Такие *сигнальные последовательности* в конце концов удаляются с помощью особых пептидаз.

в. Фосфорилирование гидроксиаминокислот

В ряде белков гидроксильные группы некоторых сериновых, треониновых и тирозиновых остатков подвергаются ферментативному фосфорилированию с участием ATP. Возникновение фосфосериновых, фосфотреониновых и фосфотирозиновых остатков в этих белках увеличивает их отрицательный заряд. В казеине, белке молока, содержится много фосфосериновых остатков, функция которых состоит в связывании ионов Ca^{2+}. Поскольку и ионы Ca^{2+}, и фосфат, а также аминокислоты необходимы грудным детям, казеин молока представляет собой источник этих трех незаменимых питательных веществ. Фосфорилирование гидроксильных групп определенных остатков серина необходимо для активаций некоторых ферментов, например гликоген-фосфорилазы (разд. 9.22). Фосфорилирование специфических остатков тирозина некоторых белков оказалось важным этапом в процессе превращения нормальных клеток в раковые.

г. Реакции карбоксилирования

К остаткам аспарагиновой и глутаминовой кислот в ряде белков могут присоединяться дополнительные карбоксильные группы. Например, белок системы свертывания крови протромбин содержит в своей N-концевой области несколько остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты (гл. 24), которые включаются в белок при помощи фермента, зависимого от витамина K. Карбоксильные группы связывают ионы Ca^{2+}, необходимые для запуска механизма свертывания крови.

д. Метилирование групп

В ряде белков определенные остатки лизина подвергаются ферментативному метилированию. Остатки монометил- и диметиллизина обнаруживаются в некоторых мышечных белках и в цитохроме *c*. В других белках метилированию подвергаются карбоксильные группы ряда остатков глутаминовой кислоты, что приводит к нейтрализации их отрицательных зарядов.

е. Присоединение боковых углеводных цепей

Боковые углеводные цепи гликопротеинов ковалентно присоединяются к полипептиду во время или после синтеза последнего. В одних гликопротеинах боковая углеводная цепь прикрепляется с помощью ферментов к остаткам аспарагиновой кислоты, в других – серина или треонина. Многие белки, которые работают вне клетки, а также «смазочные» протеогликаны, покрывающие слизистые оболочки, содержат боковые олигосахаридные цепи.

ж. Добавление простетических групп

В состав многих ферментов входят обязательные для их активности ковалентно связанные с белком простетические группы; они также присоединяются к полипептидной цепи после того, как та покидает рибосому. Примерами таких простетических групп могут служить молекула биотина, ковалентно связанная с ацетил-СоА-карбоксилазой (разд. 21.2), и гемовая группа цитохрома *c* (разд. 17.10).

з. Образование дисульфидных мостиков

Во многих белках, предназначенных для выхода из эукариотической клетки, в процессе формирования их нативной конформации появляются поперечные сшивки в результате ферментативного образования дисульфидных мостиков между остатками цистина; эти мостики соединяют друг с другом две полипептидные цепи или две части одной цепи (разд. 6.8). Поперечные дисульфидные мостики помогают уберечь нативную конформацию белковой молекулы от денатурации.

29.16. Новосинтезированные белки направляются к месту своего назначения

Некоторые новообразованные белки поступают просто в клеточный цитозоль, другие направляются к различным клеточным органеллам, третьи секретируются из клетки, четвертые встраиваются в ту или иную клеточную мембрану, где работают в качестве транспортных белков или ферментов мембран. Поэтому важно, чтобы новосинтезированный белок нашел путь к предназначенному для него месту в клетке. Каким же образом он это делает?

Многие белки содержат на своем N-конце специфические полипептидные «лидеры», которые выполняют роль сигналов, направляющих эти белки к их «рабочему» месту. Эти *сигнальные последовательности* уместно сравнить с почтовым индексом на письме. Белки, синтезируемые рибосомами шероховатого эндоплазматического ретикулума в клетках поджелудочной железы и экспортируемые из этих клеток, например трипсиноген и прокарбоксипептидаза (разд. 24.1,б), имеют на N-концах полипептидные лидирующие последовательности. Эти сигнальные последовательности состоят из 15–30 аминокислотных остатков, многие из которых содержат гидрофобные R-группы (рис. 29-20). В процессе синтеза любого белка, в том числе предназначенного на «экспорт», сигнальные лидеры, будучи расположены на N-конце, образуются первыми. Такие лидеры узнаются особыми рецепторными участками на внешней поверхности эндоплазматического ретикулума, причем это происходит даже раньше, чем рибосома полностью завершит синтез белка. Гидрофобная жирорастворимая часть лидирующей последовательности прони-

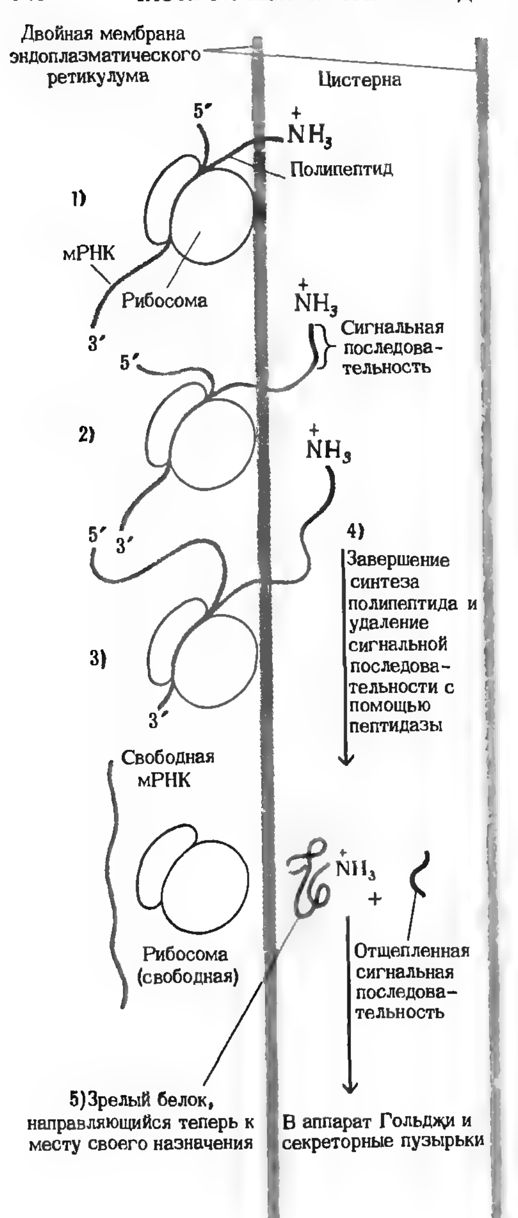


Рис. 29-20. Этапы синтеза белка, предназначенного для экспорта из клетки (*1–5*). Показаны образование и дальнейшие превращения сигнальной последовательности – полипептидного лидера, находящегося на N-конце многих белков, синтезируемых рибосомами шероховатого эндоплазматического ретикулума. Сигнальные последовательности помогают новообразованной полипептидной цепи проникать сквозь мембрану внутрь цистерн. Во время или после попадания полипептида в цистерну сигнальная последовательность отщепляется от него с помощью пептидазы.

кает сквозь мембрану внутрь цистерн эндоплазматического ретикулума, протаскивая за собой растущую полипептидную цепь. Внутри цистерн под действием особой пептидазы сигнальный лидер отщепляется. После этого зрелый белок направляется в аппарат Гольджи, инкапсулируется и в виде секреторного пузырька покидает наконец клетку. Многие другие экспортируемые белки, функционирующие вне клетки,– белки плазмы крови, полипептидные гормоны, антитела, мукопротеины – могут поступать к месту своего назначения аналогичным путем.

Весьма сходные процессы происходят и в бактериях. Наружная мембрана клеток *E. coli* состоит из липидов и белков. Последние синтезируются на рибосомах, связанных с внутренней поверхностью внутренней мембраны. Сигнальные последовательности на N-концах этих белков обеспечивают их прохождение сквозь внутреннюю мембрану и сквозь стенку к соответствующим местам наружной мембраны, где и происходит встраивание полипептида. Генетические исследования сигнальных последовательностей и пептидаз, которые их в конечном счете удаляют, стали возможны благодаря существованию соответствующих бактериальных мутантов.

29.17. Синтез белка ингибируется различными антибиотиками

Множество антибиотиков ингибируют синтез белка специфическим образом. Этот факт представляет определенный интерес с биологической точки зрения, поскольку антибиотики можно рассматривать как «химическое оружие», производимое некоторыми видами микроорганизмов и крайне токсичное для других организмов. Антибиотики стали ценным инструментом в изучении белкового синтеза, поскольку оказалось, что почти любой этап этого процесса специфически ингибируется тем или иным антибиотиком.

Одним из наиболее важных антибиотиков-ингибиторов является *пуромицин*, синтезируемый плесневым грибом

Пуромицин

Эта связь стабильна и устойчива к гидролизу

Полипептидная цепь

N-конец

А

Циклогексимид

Б

Хлорамфеникол

В

Рис. 29-21. Антибиотики – ингибиторы белкового синтеза. *А*. Пуромицин (его формула показана красным цветом), напоминающий концевой аминоациладенилат в составе аминоацил-тРНК, реагирует с С-концом растущей пептидил-тРНК, образуя пептидилпуромициновый комплекс. Однако из-за того, что связь между пуромицином и пептидом устойчива к действию ферментов, дальнейшая элонгация становится невозможной и пептидилпуромицин покидает рибосому. *Б*. Циклогексимид ингибирует синтез белка 80S-рибосомами эукариотических клеток, но не подавляет белковый синтез в прокариотах и митохондриях. *В*. Хлорамфеникол подавляет синтез белка прокариотическими и митохондриальными рибосомами, но не нарушает работу эукариотических 80S-рибосом.

Streptomyces alboniger. По своей структуре пуромицин очень напоминает 3′-конец аминоацил-тРНК (рис. 29-21). Его действие заключается в том, что он прерывает элонгацию полипептидной цепи, замещая собой поступающую в рибосому аминоацил-тРНК и приводя к образованию *пептидилпуромицина*. К пептидилпуромицину уже не способна присоединиться ни одна аминокислота; вследствие этого он отделяется от рибосомы, прекращая тем самым синтез полипептида.

Тетрациклины – антибиотики другой группы – ингибируют белковый синтез, блокируя А-участок рибосомы и лишая его способности связывать аминоацил-тРНК. *Хлорамфеникол* подавляет синтез белка, осуществляемый прокариотическими (и митохондриальными) рибосомами, но не оказывает воздействия на внемитохондриальный синтез белка у эукариот. *Циклогексимид*, наоборот, ингибирует синтез белка 80S-эукариотическими рибосомами и не нарушает работу 70S-прокариотических или митохондриальных рибосом. Здесь мы снова сталкиваемся со сходством прокариот и митохондрий. *Стрептомицин* вызывает ошибки при считывании генетической информации, а *туникамицин* препятствует прикреплению боковых олигосахаридных цепей к некоторым гликопротеинам.

К другим ингибиторам белкового синтеза относятся *дифтерийный токсин*, инактивирующий один из факторов элонгации, и *рицин*, чрезвычайно токсичный белок из клещевины обыкновенной, который инактивирует 60S-субчастицу эукариотических рибосом.

29.18. Генетический код расшифрован

Теперь мы рассмотрим более подробно, каким образом четырехбуквенный язык ДНК переводится на двадцатибуквенный язык белков. Уже давно было ясно, что для кодирования каждой аминокислоты требуется по меньшей мере три нуклеотидных остатка ДНК, поскольку из четырех кодовых букв ДНК (А, Т, G и С) можно составить всего 16 различных сочетаний по два ($4^2 = 16$), а этого недостаточно, чтобы кодировать 20 аминокислот. Если же из четырех оснований составить сочетания по три, то можно получить $4^3 = 64$ различных комбинации. Ранние генетические эксперименты окончательно доказали не только то, что слова генетического кода для любой аминокислоты представляют собой триплеты нуклеотидов, но и то, что между кодонами для соседних аминокислот нет знаков препинания. Однако оставался невыясненным основной вопрос: какие конкретно трехбуквенные кодовые слова соответствуют каждой из аминокислот? Как можно определить это экспериментально?

В 1961 г. Маршалл Ниренберг и Генрих Маттеи сообщили о своем эксперименте, который стал важнейшим событием в этой области. Они инкубировали в двадцати различных пробирках синтетический полирибонуклеотид полиуридиловую кислоту с экстрактом из *E. coli*, GTP и смесью двадцати аминокислот. В каждой пробирке радиоактивно меченной была только одна из аминокислот. Из того, что полиуридиловая кислота (ее обозначают polyU) представляет собой искусственную мРНК, несущую множество расположенных друг за другом триплетов UUU, следовало, что она должна направлять синтез радиоактивного полипептида, состоящего только из одной аминокислоты, а именно той, которая кодируется триплетом UUU. Радиоактивный полипептид синтезировался лишь в одной из двадцати пробирок – в той, где находился радиоактивный фенилаланин. Радиоактивный полипептид оказался полифенилаланином, т. е. содержал только остатки фенилаланина. Отсюда Ниренберг и Маттеи сделали вывод о том, что триплет UUU кодирует фенилаланин. Очень скоро с помощью аналогичного подхода было найдено, что синтетическая матрица полицитидиловая кислота (polyC) кодирует синтез полипептида, состоящего из одних пролиновых остатков (полипролин), а полиадениловая кислота (polyA) кодирует полилизин. Следовательно, триплет CCC должен соответствовать пролину, а триплет AAA – лизину.

Использовавшиеся в этих экспериментах синтетические полинуклеотиды были получены с помощью полинуклеотидфосфорилазы (разд. 28.28), которая легко образует РНК-подобные полимеры из ADP, UDP, CDP и GDP. Этому ферменту не нужна матрица; он синтезирует полимеры, нуклеотидный состав которых отражает относительные концентрации исходных нуклеозид-5'-дифосфатов, присутствующих в среде. Если в среде содержится один уридиндифосфат, то полинуклеотидфосфорилаза синтезирует только polyU. Если исходная смесь состоит из двух частей ADP и одной части GDP, то синтезируется полимер, в котором около двух третей составляют остатки А и одну треть – остатки G. В таком полимере с неспецифической нуклеотидной последовательностью, вероятно, много триплетов AAA, меньше триплетов AAG, AGA и GAA, сравнительно мало триплетов AGG, GGA и GAG и очень мало триплетов GGG. Используя разные синтетические полирибонуклеотиды, полученные при помощи полинуклеотидфосфорилазы из различных исходных смесей ADP, UDP, GDP и CDP и выполняющие роль мРНК, вскоре удалось определить состав триплетов для всех аминокислот. Однако эти эксперименты не давали возможность выявить нуклеотидную последовательность в каждом кодирующем триплете, т. е. понять, в каком порядке расположены буквы, составляющие этот кодон.

В 1964 г. Ниренберг и Филип Ледер сделали другое открытие, которое привело к решению этой проблемы. Они обна-

ружили, что выделенные из *E. coli* рибосомы связывают специфическую аминоацил-тРНК даже в отсутствие GTP, если в смеси присутствует соответствующая синтетическая полинуклеотидная матрица. Например, рибосомы, инкубируемые с polyU и фенилаланил-тРНК^{Phe}, связываются с обеими макромолекулами; если же рибосомы инкубируют с polyU и какой-нибудь другой аминоацил-тРНК, то последняя не связывается с рибосомами, поскольку ее антикодон не узнает триплет UUU в polyU-матрице. Самым коротким полинуклеотидом, способным обеспечить специфическое связывание фенилаланил-тРНК^{Phe}, оказался тринуклеотид UUU. С помощью простых тринуклеотидов известной структуры удалось установить нуклеотидную последовательность в кодонах, определяющих связывание разных аминоацил-тРНК. Использование этого и других подходов позволило вскоре выяснить нуклеотидную последовательность во всех триплетах для каждой аминокислоты. Эти кодовые слова были проверены множеством разных способов. Полный кодовый «словарь» аминокислот приведен на рис. 29-22. Расшифровка генетического кода явилась крупнейшим научным достижением 60-х годов.

Вторая буква кодонов

Первая буква кодонов (5′-конец)	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Стоп	UGA	Стоп
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Стоп	UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	[redacted]	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

Рис. 29-22. «Словарь» аминокислотного кода, при помощи которого в мРНК записана информация о кодируемом ею белке. Кодоны считываются в направлении 5′ → 3′. Первое и второе основания обозначены черным цветом; третье основание (оно показано красным цветом) менее специфично, чем первые два. Три терминирующих кодона представлены на сером фоне, а инициирующий кодон – на красном. Обратите внимание, что всем аминокислотам, кроме метионина и триптофана, соответствует больше одного кодона. Слова аминокислотного кода в том виде, в каком они записаны в ДНК, комплементарны кодовым словам мРНК, но антипараллельны им и содержат остатки T в положениях, комплементарных A, и остатки A в положениях, комплементарных U. Например, кодоны мРНК и ДНК для метионина выглядят так:
мРНК (5′) AUG (3′)
ДНК (3′) TAC (5′)
Обычно кодоны и антикодоны записывают в направлении 5′ → 3′, слева направо.

29.19. Генетический код обладает рядом интересных особенностей

Во-первых, следует еще раз отметить, что в коде отсутствуют знаки препинания, т. е. сигналы, показывающие конец одного кодона и начало следующего. Таким образом, рамка считывания должна быть правильно установлена в начале прочтения молекулы мРНК и затем двигаться последовательно от одного триплета к следующему. Если исходная рамка считывания «сбита» на один или два нуклеотида или же если рибосома случайно пропустит один нуклеотид в мРНК, все последующие кодоны выйдут из правильной рамки и это приведет к образованию белка с искаженной аминокислотной последовательностью.

Во-вторых, отметим, что 3 из 64 возможных нуклеотидных триплетов (UAG, UAA и UGA) не кодируют ни одну из известных аминокислот (рис. 29-22); это нонсенс-кодоны, которые в норме сигнализируют об окончании синтеза полипептидной цепи. Кодон AUG представляет собой инициирующий кодон и у прокариот, и у эукариот; кроме того, во внутренних положениях полипептидной цепи он кодирует метионин.

Третье важное свойство кода состоит в том, что кодовые слова аминокислот (рис. 29-22) одинаковы у всех изученных организмов, включая человека, *E. coli*, растения, земноводных и все другие виды, в том числе и вирусы. Таким образом, создавалось впечатление, что все

Таблица 29-2. Вырожденность аминокислотного кода

Аминокислота	Число кодонов	Аминокислота	Число кодонов
Ala	4	Leu	6
Arg	6	Lys	2
Asn	2	Met	1
Asp	2	Phe	2
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Ser	6
Glu	2	Thr	4
Gly	4	Trp	1
His	2	Tyr	2
Ile	3	Val	4

виды растений и животных имели общего эволюционного предшественника с одним генетическим кодом, полностью сохранившимся на протяжении всей биологической эволюции. Поэтому широко распространилось мнение о том, что генетический код универсален. Однако неожиданно появились новые факты. Сравнительно недавно было обнаружено, что в процессе синтеза белка митохондриями в присутствии рибосом, тРНК и мРНК митохондриального происхождения ряд аминокислотных кодонов используется не в соответствии с их значением по стандартному кодовому «словарю» (рис. 29-22). Например, митохондрии человека используют триплет AUA в качестве кодона для метионина, а не для изолейцина, а триплет UGA, служащий обычно терминирующим кодоном, в этих митохондриях кодирует триптофан. Значение этих фактов представляет собой пока мучительную загадку для ученых. Сделанные наблюдения побудили развернуть интенсивный поиск других существенных отличий в биохимической генетике митохондрий, которые могут дать ключ к проблеме происхождения митохондрий и эукариотических клеток.

Наиболее удивительным свойством генетического кода является, вероятно, его *вырожденность.* Слово «вырожденность» – это математический термин, указывающий в данном случае на то, что аминокислоте может соответствовать больше чем один кодон (табл. 29-2). Только метионин и триптофан кодируются одним кодоном. Вырожденность кода вовсе не означает его несовершенство, поскольку нет ни одного кодона, который бы кодировал несколько аминокислот. Вырожденность кода неодинакова для разных аминокислот. Так, лейцину и серину соответствует по шесть кодонов, глицину и аланину – по четыре, а глутаминовой кислоте, тирозину и гистидину – по два.

Если аминокислота кодируется несколькими кодонами, то в большинстве случаев эти кодоны различаются по третьей букве, т. е. по нуклеотиду на их 3'-конце (рис. 29-22). Например, аланин кодируется триплетами GCU, GCC, GCA и GCG, т. е. две первые буквы GC у всех аланиновых кодонов одинаковы. Кодоны почти всех аминокислот состоят из триплетов, которые можно представить в виде XY^{A}_{G} или XY^{U}_{C}. Специфичность каждого кодона определяется главным образом его первыми двумя буквами; третья же буква, т. е. нуклеотид на 3'-конце, обладает меньшей специфичностью. Рассмотрим этот вопрос подробнее.

29.20. «Качание» позволяет ряду тРНК узнавать несколько кодонов

Можно было бы ожидать, что в соответствии с уотсон-криковским спариванием оснований антикодоновый триплет данной тРНК будет узнавать только один кодоновый триплет, т. е. для каждого кодона должна существовать отдельная тРНК. Однако число различных тРНК для каждой аминокислоты не совпадает с числом кодирующих ее кодонов. Отметим также, что некоторые тРНК содержат нуклеозид *инозин* (обозначаемый символом I), в состав которого входит основание *гипоксантин*, образующийся из аденина после гидролитического отщепления его 6-аминогруппы. Молекулярные модели показывают, что I может образовывать водородные связи с тремя основаниями, а именно с U, C и A, но такое комплементарное взаимодействие оказывается более слабым, чем взаимодействие уотсон-криковского типа при образовании обычных пар G–C

и A – U. Например, одна из аргининовых тРНК имеет антикодон (5′) I – C – G (3′), который может узнавать три разных аргининовых кодона: (5′) C – G – A (3′), (5′) C – G – U (3′) и (5′) C – G – C (3′). Два первых основания этих кодонов одинаковы (C – G) и образуют прочные уотсон-криковские пары (показаны красным цветом) с соответствующими основаниями антикодона:

Антикодон (3′) G—C—I (5′) (3′) G—C—I (3′) G—C—I
Кодон (5′) C—G—A (3′) (5′) C—G—U (5′) C—G—C

Вместе с тем третьи основания аргининовых кодонов (A, U и C) образуют довольно слабые водородные связи (показаны черным цветом) с остатком I в антикодоне. Изучение этих и других кодон-антикодоновых пар привело Френсиса Крика к выводу о том, что третье основание большинства кодонов имеет определенную степень свободы при образовании пары с соответствующим основанием антикодонов той же специфичности, т. е., как образно выразился сам Крик, третьи основания таких кодонов «качаются». Крик сформулировал четыре положения, совокупность которых известна под названием *гипотезы «качания»* (wobble hypothesis).

1. Два первых основания кодона всегда образуют прочные уотсон-криковские пары с соответствующими основаниями антикодона и вносят наибольший вклад в специфичность кодирования.

2. Первое основание ряда антикодонов (если читать в направлении 5′ → 3′) позволяет им читать больше одного кодона для данной аминокислоты. Если первое основание антикодона C или A, то такой антикодон способен читать только один кодон; если это U или G, то такой антикодон может прочитать два разных кодона. Если «качающимся» нуклеозидом антикодона является I или некоторые другие модифицированные остатки, то антикодон может прочитать три различных кодона. Таким образом, I в первом положении антикодона позволяет этому антикодону узнать максимальное число кодонов для любой данной аминокислоты. Описанные выше взаимоотношения между кодонами и антикодонами суммированы в табл. 29-3.

3. Кодоны для данной аминокислоты, отличающиеся по любому из первых двух оснований, требуют разных тРНК.

4. Для трансляции всех кодонов, соответствующих определенным аминокислотам (число этих кодонов 61), необходимо как минимум 32 тРНК.

Таблица 29-3. «Качающееся» основание в 5′-положении антикодона тРНК определяет, сколько кодонов данной аминокислоты может узнать эта тРНК

В дальнейшем X и Y обозначают комплементарные основания, способные образовать друг с другом прочную уотсон-криковскую пару. «Качающиеся» основания в 3′-положении кодона и 5′-положении антикодона выделены красным цветом.

1. Если в 5′-положении антикодона находится C или A, то такая тРНК может узнавать только один кодон, который в 3′-положении должен содержать G или U соответственно. C и A образуют с G и U соответственно прочную уотсон-криковскую пару.

Антикодон (3′) X-Y-C (5′) (3′) X-Y-A (5′)
Кодон (5′) Y-X-G (3′) (5′) Y-X-U (3′)

2. Если в 5′-положении антикодона находится U или G, то такая тРНК может узнавать два разных кодона. Один из них образует слабую, или «качающуюся», пару в 3′-положении, другой – прочную уотсон-криковскую пару.

Антикодон (3′) X-Y-U (5′) (3′) X-Y-G (5′)
Кодон (5′) Y-X-A (прочное связывание) / G ("качание") (5′) Y-X-C (прочное связывание) / U ("качание")

3. Если в 5′-положении антикодона находится I или какой-либо другой модифицированный нуклеозид, то такая тРНК может узнавать три разных кодона, причем все они образуют «качающиеся» пары в 3′-положении.

Антикодон (3′) X-Y-I (5′)
Кодон (5′) Y-X-A / U / C (все пары "качаются")

Чем объясняется такая неожиданная сложность кодон-антикодоновых взаимодействий? Если сформулировать вкратце, то полагают, что специфичность кодон-антикодонового взаимодействия обеспечивается главным образом двумя первыми основаниями кодонов; «качающееся», т. е. третье, основание также вносит вклад в специфичность, однако благодаря тому, что образуемая им с соответствующим ему основанием пара непрочна, тРНК легче освобождается из комплекса с мРНК в процессе синтеза белка. Если бы в сильное уотсон-криковское взаимодействие с соответствующими основаниями антикодонов были вовлечены все три основания кодонов, то кодон-антикодоновые связи были бы настолько прочны, что высвобождение тРНК из комплекса с мРНК происходило бы медленно, лимитируя скорость белкового синтеза. Следовательно, в ходе биохимической эволюции большинство кодон-антикодоновых взаимодействий оптимизировалось с учетом как точности, так и скорости синтеза белка.

29.21. Вирусные ДНК иногда содержат гены внутри других генов или перекрывающиеся гены

Долгое время основополагающим принципом молекулярной биологии считался тот факт, что нуклеотидная последовательность гена в точности коллинеарна последовательности транскрибированной с него мРНК и далее последовательности кодируемого им полипептида. Однако мы видели, что многие эукариотические гены содержат вставочные нетранслируемые нуклеотидные последовательности – интроны, которые нарушают абсолютную коллинеарность гена и кодируемого им полипептида (разд. 27.28 и 28.23).

Дополнительные вопросы относительно принципа коллинеарности возникли в результате другого удивительного открытия. Обнаружилось, что в ряде вирусов одна и та же нуклеотидная последовательность ДНК кодирует два различных белка, для чего используются две разные рамки считывания кодонов. Существование таких «генов внутри генов» было показано при изучении ДНК бактериофага фX174, которая состоит, как выяснилось, из 5386 нуклеотидных остатков, а этого недостаточно, чтобы кодировать девять разных белков, синтезируемых этим вирусом. Как только Сэнгер и его коллеги установили полную нуклеотидную последовательность хромосомы фX174 (с. 850), они внимательно проанализировали ее и сопоставили с аминокислотной последовательностью белков, кодируемых генами фX174. В результате в ДНК фX174 было обнаружено несколько перекрывающихся генных по-

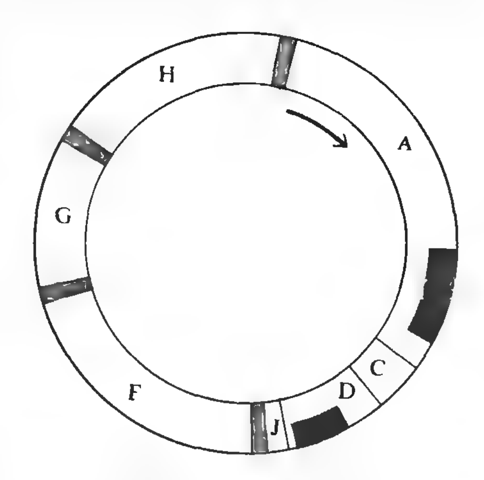


Рис. 29-23. Гены внутри генов. ДНК фага фX174 содержит девять генов (A-J). Белки, кодируемые этой ДНК, содержат большее число аминокислотных остатков, чем может быть закодировано 5386 нуклеотидами, найденными в ДНК фага. Поэтому было высказано предположение, согласно которому какая-то часть ДНК должна кодировать больше чем один ген. При сравнении нуклеотидной последовательности ДНК с аминокислотными последовательностями кодируемых ею белков обнаружилось, что ген B расположен внутри гена A, но для этих двух генов используются разные рамки считывания. Аналогичным образом, ген E лежит внутри гена D и также имеет другую рамку считывания (см. рис. 29-24). «Внутренние» гены обозначены красным цветом; серым цветом показаны нетранслируемые спейсерные участки ДНК. Кроме генов B и E, расположенных внутри генов A и D, в ДНК фага фX174 имеются короткие участки перекрывания между другими генами. В пяти случаях инициирующий сигнал одного гена перекрывает терминирующий сигнал предыдущего; при этом сигналы используют разные рамки считывания.

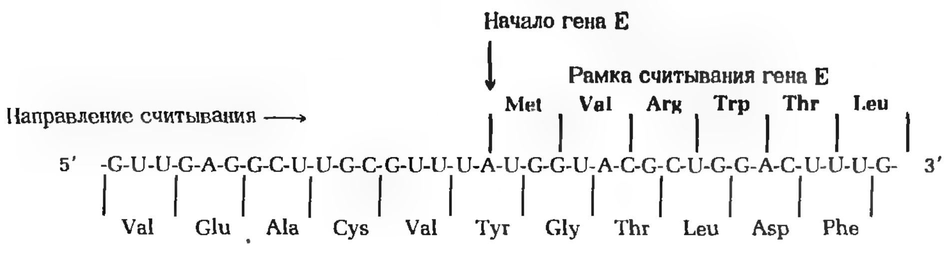
следовательностей. На рис. 29-23 показано, что гены B и E расположены внутри соответственно генов A и D и что в пяти случаях стартовый кодон одного гена перекрывает терминирующий кодон другого. Рис. 29-24 поясняет, каким образом гены D и E занимают один и тот же участок ДНК, но используют разные рамки считывания; аналогичная ситуация имеет место в случае генов A и B. Протяженность перекрывающихся последовательностей и внутренних генов полностью компенсирует нехватку нуклеотидов в ДНК φX174, если учесть общее число аминокислотных остатков, содержащихся в девяти кодируемых ею белках.

За этим открытием вскоре последовали подобные наблюдения и на других вирусных ДНК, в том числе на ДНК фага λ, онкогенного обезьяньего вируса 40(SV40) и фага G4 – близкого родственника фага φX174. Фаг G4 замечателен тем, что у него есть по крайней мере один кодон, который используется тремя различными генами. Было высказано предположение, что перекрывающиеся гены или гены внутри генов существуют только в геномах вирусов. Фиксированный размер вирусного капсида обусловливает экономное использование ограниченного количества ДНК, которая должна кодировать белки, нужные для обеспечения инфекционности вирусной частицы и для поддержания ее способности к репликации.

Рис. 29-24. Участок нуклеотидной последовательности транскрипта мРНК гена D в ДНК φX174. Видно, каким образом ген E, лежащий внутри гена D, кодируется рамкой считывания, отличной от рамки считывания гена D. Рамки считывания генов обозначены разным цветом.

29.22. Синтез белка регулируется

Живые клетки имеют точно запрограммированные механизмы, регулирующие синтез различных белков таким образом, что в любой клетке присутствует определенное количество молекул каждого белка, позволяющее ей осуществлять свои метаболические процессы плавно и с максимальной эффективностью. Мы уже знаем, что ДНК *E. coli* содержит гены для более чем 3000 разных белков. Однако 3000 белков *E. coli* присутствуют в клетке не в одинаковых количествах. Реально число копий отдельных белков может быть различным; более того, число копий некоторых из них постоянно, тогда как число копий других может варьировать. Одна клетка *E. coli* содержит около 15000 рибосом; значит, каждый из 50 (или большего числа) рибосомных белков присутствует в клетке в 15000 копий. Число копий гликолитических ферментов также, по-видимому, поддерживается в клетке на постоянном и очень высоком уровне. Вместе с тем β-галактозидаза обычно присутствует в клетке *E. coli* в очень малых количествах – всего около пяти молекул. Однако, как мы увидим ниже, число молекул этого фермента может резко увеличиваться в ответ на изменения в доступности определенных питательных веществ в окружающей среде. Благодаря регуляции синтеза ферментов в клетках любого типа создается «правильный» набор ферментов, обеспечивающий нормальное протекание основных клеточных процессов. Регуляция позволяет также бактериям экономно использовать аминокислоты для синтеза тех белков, которые нужны им лишь



в очень малых количествах или только изредка.

У высших организмов процессы биосинтеза белка регулируются значительно сложнее. Хотя каждая клетка позвоночного содержит полный геном данного организма, в клетке данного типа экспрессируется только часть структурных генов. Почти во всех клетках высших животных присутствуют наборы основных ферментов, необходимые для реализации главных путей метаболизма. Однако клетки разных типов, например клетки мышц, мозга, печени, содержат свойственные только им структуры и выполняют только им присущие биологические функции, реализация которых обеспечивается наборами специализированных белков. Например, клетки скелетных мышц содержат огромное количество ориентированных миозиновых и актиновых нитей (разд. 14.14), тогда как в печени миозина и актина очень мало. Точно так же клетки мозга содержат ферменты, необходимые для синтеза большого числа различных веществ – медиаторов нервных импульсов, в то время как клетки печени этих ферментов вообще не содержат. Вместе с тем в печени млекопитающих присутствуют все ферменты, необходимые для образования мочевины, тогда как в других тканях этих ферментов нет и они не обладают способностью синтезировать мочевину (разд. 19.15). Кроме того, биосинтез разных наборов специализированных белков должен быть точно запрограммирован в последовательности и времени их появления в ходе строго упорядоченной дифференцировки и роста высших организмов. Пока нам сравнительно мало что известно о регуляции экспрессии генов в эукариотических организмах с их многочисленными хромосомами. Однако сегодня мы располагаем значительной информацией о регуляции синтеза белка у прокариот. К ней мы сейчас и перейдем.

29.23. Бактерии содержат конститутивные и индуцируемые ферменты

Конститутивными называются такие ферменты, которые присутствуют в бактериальных клетках в постоянных количествах независимо от метаболического состояния организма. Примерами конститутивных ферментов служат ферменты, участвующие в главных путях катаболизма, таких, как гликолиз. Напротив, концентрация *индуцируемых* ферментов в клетке меняется. Обычно индуцируемый фермент содержится в бактериальной клетке лишь в следовых количествах, однако если в среду добавить его субстрат, особенно если этот субстрат представляет собой единственный источник углерода клетки, то концентрация такого фермента может быстро возрасти в тысячу раз или даже больше. В этих условиях индуцируемые ферменты могут потребоваться для транспортировки субстрата внутрь клетки и превращения его в метаболит, который клетка способна использовать. Таким индуцируемым ферментом является, например, β-галактозидаза, которая катализирует первую стадию процесса утилизации лактозы, а именно ее гидролитическое расщепление до D-глюкозы и D-галактозы (разд. 15.10). В обычных условиях, если в среде присутствует много глюкозы, *E. coli* лактозу не усваивает, поскольку в каждой клетке содержится всего около пяти молекул β-галактозидазы. Однако если поместить клетки *E. coli* в среду с лактозой в качестве единственного источника энергии и углерода, то уже через 1–2 мин клетки начинают синтезировать β-галактозидазу в больших количествах, достигая уровня, превышающего 1000 молекул на клетку. Индуцируемая β-галактозидаза гидролизует лактозу до D-глюкозы и D-галактозы, которые затем могут использоваться как источник энергии и углерода. Если теперь индуцированные лактозой клетки *E. coli* перенести на свежую среду, содержащую вместо лактозы глюкозу, то дальнейший синтез β-галактозидазы немедленно прекращается. Таким образом,

мы видим, что индукция ферментов – это экономичный процесс; индуцируемые ферменты синтезируются лишь тогда, когда в них возникает потребность. Вещество, способное индуцировать синтез фермента или группы ферментов, называется *индуктором*.

Если к клеткам *E. coli* добавить в отсутствие глюкозы какой-нибудь β-галактозид типа лактозы, то они начнут синтезировать в больших количествах не только β-галактозидазу, но и два других функционально связанных с ней белка – *β-галактозидпермеазу* и *белок А*. Пермеаза – мембранный белок, способствующий транспорту β-галактозидов из внешней среды в клетку. Функция белка А не совсем ясна, однако не исключено, что он играет важную роль в процессе метаболической утилизации галактозидов. Если один индуктор вызывает синтез группы связанных между собой ферментов или белков, как это имеет место в данном случае, такой процесс называют *координированной индукцией*. Сегодня мы знаем, что *E. coli* и другие бактерии способны в ответ на различные специфические индукторы синтезировать большое число разных связанных друг с другом ферментов или групп ферментов. Такая способность позволяет бактериям быстро приспосабливаться к новым условиям и экономно использовать самые разнообразные питательные вещества, которые появляются в окружающей среде.

29.24. У прокариот существует также репрессия ферментов

Другой важный тип изменения концентрации фермента в бактериальной клетке, противоположный по своему проявлению индукции ферментов,– это *репрессия ферментов*. Когда клетки *E. coli* растут на среде, содержащей в качестве единственного источника азота соль аммония, им приходится синтезировать все азотсодержащие соединения из иона NH_4^+ и источника углерода. Такие клетки, очевидно, должны содержать все ферментные системы для синтеза 20 различных аминокислот. Однако если добавить в среду одну из аминокислот, скажем гистидин, то клетка перестанет вырабатывать весь набор ферментов, необходимых для синтеза гистидина из аммиака и источника углерода, в то время как для остальных 19 аминокислот она продолжает синтезировать ферментные наборы. Поскольку популяция клеток продолжает расти и делиться, удельная активность оставшихся гистидинсинтезирующих ферментов снижается. Выключение синтеза ферментов, ответственных за образование гистидина, вызванное добавлением гистидина, называется *репрессией ферментов*. Репрессия, так же как и индукция, представляет собой отражение принципа клеточной экономии: как только ферменты биосинтеза гистидина больше не требуются, они перестают вырабатываться. В большинстве случаев репрессия ферментов затрагивает ферменты, участвующие в биосинтезе, особенно в биосинтезе аминокислот. Репрессия целого набора ферментов, катализирующих последовательность биосинтетических реакций, конечным продуктом этой цепи, как это имеет место в случае ферментов, синтезирующих гистидин, называется *координированной репрессией*, или *репрессией конечным продуктом*.

29.25. Гипотеза оперона

Молекулярные и генетические связи между индукцией и репрессией ферментов прояснились в результате генетических исследований Франсуа Жакоба и Жака Моно из Пастеровского института в Париже. Их классическая работа по индукции β-галактозидазной активности в клетках *E. coli* привела авторов к формулированию *гипотезы оперона* для объяснения генетического контроля синтеза белка у прокариот. С тех пор эта гипотеза получила полное подтверждение в прямых биохимических экспериментах. Тип регуляции белкового синтеза, рассматриваемый в гипотезе оперона, представляет собой *контроль на уровне транскрипции*, поскольку регуляция здесь осуществляется главным образом за счет изменения скорости транскрипции генов, т. е. на стадии образования мРНК. Дру-

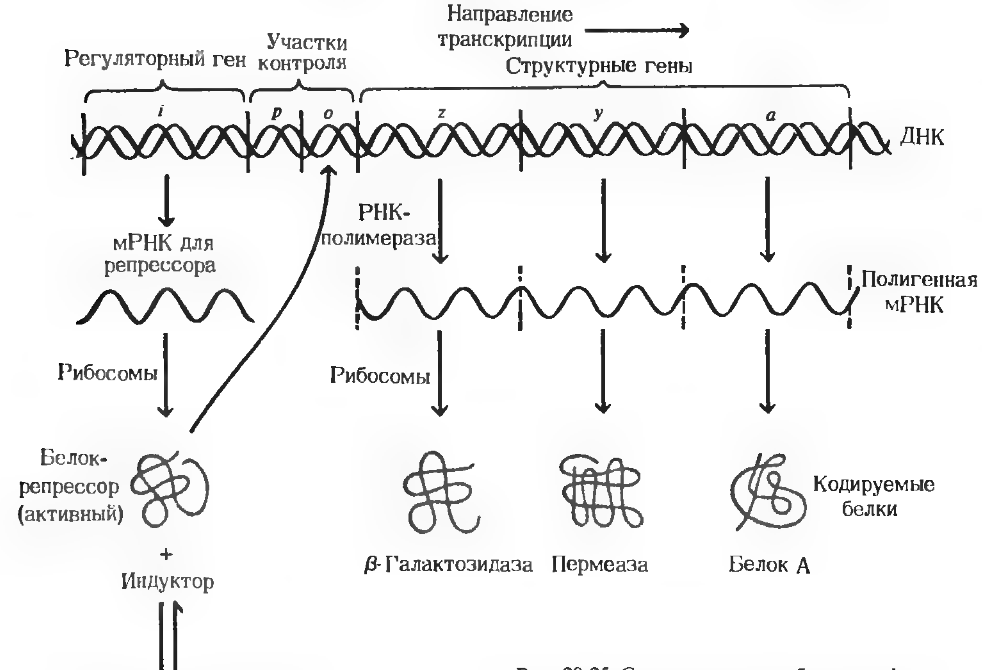


Рис. 29-25. Схематическое изображение *lac*-оперона. Три структурных *lac*-гена *z*, *y* и *a* расположены рядом. Перед ними находятся два регуляторных участка – *p* (промотор) и *o* (оператор). Рисунок дан не в масштабе; участки *p* и *o* очень малы по сравнению с генами. Регуляторный ген *i* кодирует белок-репрессор. Этот белок имеет два центра связывания: один для оператора, другой для индуктора. Активная форма белка-репрессора может присоединяться к оператору, препятствуя тем самым связыванию РНК-полимеразы и последующей транскрипции структурных генов *z*, *y* и *a*. В этих условиях β-галактозидаза и два других белка клетками не синтезируются. Однако, если в среде вместо глюкозы присутствует лактоза, индуктор соединяется с репрессором, переводя его в неактивное состояние, в котором тот не способен взаимодействовать с оператором. В этом случае РНК-полимераза может связаться с промотором, пройти через зону оператора и начать транскрибировать три структурных гена с образованием полигенной мРНК, которая кодирует синтез трех *lac*-белков в рибосомах. Более детально функция промотора рассмотрена на рис. 29-27. Лактоза сама по себе не служит индуктором *lac*-оперона; эту функцию выполняет ее изомер аллолактоза, образующаяся из лактозы.

гой основной путь регуляции белкового синтеза – это *контроль на уровне трансляции*, т. е. регуляция скорости синтеза полипептидной цепи на матрице мРНК. У бактерий ведущая роль в регуляции экспрессии генов принадлежит, по-видимому, контролю на уровне транскрипции. Контроль биосинтеза белка на уровне трансляции, механизм которого остается не совсем понятным, имеет, вероятно, второстепенное значение для бактерий, но он очень важен для эукариот. Кроме этого, в клетках существуют и другие механизмы, которые позволяют выполнять тонкую регулировку скорости синтеза белка.

На основании своих экспериментов Жакоб и Моно предположили, что три структурных гена *z*, *y* и *a*, кодирующие синтез индуцируемых лактозой ферментов β-галактозидазы, β-галактозидпермеазы и белка А соответственно, расположены в хромосоме *E. coli* рядом (рис. 29-25). Далее они предположили, что в ДНК около этих генов находится другой, ингибиторный участок *i*, который способен ингибировать транскрипцию трех структурных генов *z*, *y* и *a*. Было постулировано, что участок *i* представляет собой *регуляторный ген* (разд. 27.21), кодирующий аминокислотную последовательность регуляторного белка, называе-

мого *репрессором*. Когда ген *i* транскрибируется с образованием соответствующей мРНК, последняя поступает в рибосомы, где на ней, как на матрице, синтезируется репрессор. Белок-репрессор может связываться с другим специфическим участком ДНК, который называется оператором (рис. 29-25). Было высказано предположение, что связывание белка-репрессора с операторным участком ДНК подавляет катализируемый РНК-полимеразой процесс транскрипции трех структурных генов *z*, *y* и *a*, которые кодируют ферменты, индуцируемые β-галактозидами. В результате из-за отсутствия матрицы синтез этих ферментов подавляется (т. е. репрессируется).

Чтобы объяснить действие индуктора (случай, когда глюкозы в среде нет, но присутствует лактоза), Жакоб и Моно предположили, что индуктор взаимодействует со вторым специфическим связывающим участком белка-репрессора, т. е. с центром связывания индуктора. При этом образуется индуктор-репрессорный комплекс, что приводит к снижению сродства репрессора к операторному участку ДНК и к освобождению последнего. Как только индуктор-репрессорный комплекс покидает оператор, структурные гены β-галактозидазы и двух других белков оказываются доступными для транскрипции и РНК-полимераза синтезирует с них мРНК. Эти мРНК используются далее в качестве матриц для синтеза указанных белков в рибосомах, в результате чего клетка получает возможность утилизировать лактозу в качестве источника углерода и энергии.

Предположим теперь, что мы изъяли клетки из среды с лактозой, промыли их и поместили в среду, содержащую вместо лактозы D-глюкозу – субстрат, который клетки всегда способны утилизировать. Поскольку концентрация лактозы в клетке становится при этом исчезающе малой, индуктор, связанный с белком-репрессором, отделяется от него, молекула репрессора возвращается в свое активное состояние и со свойственной ему высокой степенью сродства присоединяется к оператору. Вследствие этого структурные гены β-галактозидазы и двух других белков перестают транскрибироваться и из-за отсутствия их мРНК синтез данных белков прекращается. Таким образом, белок-репрессор благодаря своей способности обратимо связываться то с индуктором, то с оператором (но не одновременно с обоими) может определять как индукцию, так и репрессию синтеза галактозидазы.

Три структурных гена *z*, *y* и *a* вместе с их оператором *o* были названы Жакобом и Моно опероном, в данном случае *lac*-опероном (рис. 29-25). Таким образом, в состав оперона входит группа функционально связанных друг с другом структурных генов, которые могут координированно включаться и выключаться, и их оператор. У *E. coli*, *Salmonella typhimurium* и других бактерий было выявлено большое число оперонов (табл. 29-4). Одним из наиболее сложных оперонов является гистидиновый оперон. Он состоит из девяти структурных генов, кодирующих набор ферментов, необходимых для биосинтеза гистидина. Регуляторный ген *his*-оперона кодирует белок-репрессор, который присоединяется к *his*-оператору и тем самым препятствует транскрипции всех девяти белков оперона в условиях, когда в среде присутствует достаточное количество гистидина.

Таблица 29-4. Некоторые бактериальные опероны

Оперон	Число ферментных белков	Функция
lac	3	Гидролиз и транспорт β-галактозидов
his	9	Синтез гистидина
leu	4	Превращение α-кетоизовалерьяновой кислоты в лейцин
ara	4	Транспорт и утилизация арабинозы

29.26. Молекулы репрессора были выделены

В 1967 г. Уолтеру Гилберту и Бенно Мюллер-Хиллу удалось выделить *lac*-ре-

прессор, предсказанный гипотезой Жакоба и Моно. Выяснилось, что этот репрессор действительно является белком и что в его молекуле имеется два отдельных центра, один для связывания с индуктором, а другой для связывания со специфическим участком ДНК *E. coli.* Если центр связывания с индуктором свободен, то *lac*-репрессор прочно взаимодействует со специфическим участком ДНК; если же центр связывания с индуктором занят, то репрессор не может уже оставаться связанным с операторным участком и покидает его. Выделение *lac*-репрессора было очень трудной задачей, поскольку обычно в клетке *E. coli* присутствует всего около 10 молекул этого белка.

Молекулярная масса *lac*-репрессора составляет приблизительно 150000. В отсутствие индуктора он обладает исключительно высоким сродством к соответствующему участку ДНК *E. coli*: 50%-ное (по отношению к максимальному уровню) связывание репрессора с оператором достигается при концентрации репрессора 10^{-13} М. На рис. 29-26 представлена электронная микрофотография *lac*-репрессора, прикрепленного к операторному участку ДНК *E. coli.*

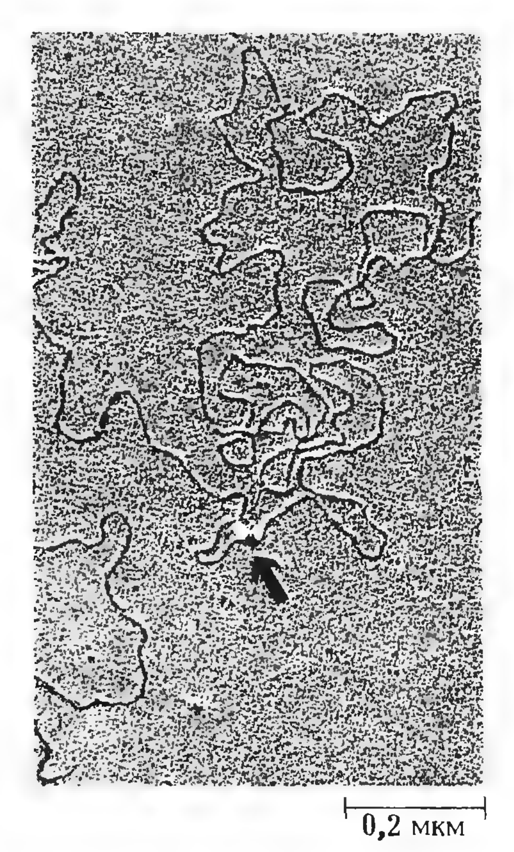


Рис. 29-26. Электронная микрофотография участка ДНК *E. coli*, на которой видна молекула *lac*-репрессора (указана стрелкой), присоединенная к *lac*-оператору.

29.27. В оперонах имеется еще промоторный участок

Мы уже видели, что если в среде присутствует лактоза и нет глюкозы, то индуктор, соединяясь с репрессором, «снимает» его с оператора и тем самым дает возможность транскрибироваться *lac*-генам и соответственно синтезироваться *lac*-белкам. Предположим теперь, что в среде находятся и лактоза, и глюкоза. В этих условиях *E. coli* использует только глюкозу, пренебрегая лактозой. Более того, клетки перестают синтезировать *lac*-белки. Репрессия синтеза *lac*-белков глюкозой называется *катаболитной репрессией*. Клетки *E. coli* способны чувствовать, доступна ли глюкоза, с помощью другого регуляторного механизма, который совместно с *lac*-репрессором и оператором контролирует синтез *lac*-ферментов.

В дополнение к *i*-гену и оператору (*o*-участку) в ДНК существует еще один особый регуляторный участок — *промотор*, или *p*-участок, расположенный между геном *i* и оператором (рис. 29-27). Промотор в свою очередь состоит из двух функционально различных частей. Рядом с оператором находится «вход для РНК-полимеразы», т. е. участок, в котором происходит первоначальное связывание РНК-полимеразы. Вторая часть промотора представляет собой специфический участок связывания другого регуляторного белка — *белка, активирующего катаболитный ген* (БАК или CAP от англ. catabolite activator protein). Эта часть промоторного участка держит под своим контролем другую его часть, ответственную за связывание РНК-полиме-

Рис. 29-27. *А*. Регуляторные участки *lac*-оперона. САР-участок промотора способен связывать САР лишь в том случае, если он находится в комплексе с сАМР. РНК-полимераза может попасть в участок первоначального связывания только при условии, если САР-участок занят. Репрессор взаимодействует с оператором лишь в отсутствие индуктора. *Б*. Три структурных гена *z*, *y* и *a* *lac*-оперона транскрибируются при условии, что в среде нет глюкозы, а присутствует лактоза. В этом случае оператор свободен от репрессора и комплекс САР–сАМР соединяется с промотором, позволяя РНК-полимеразе попасть в участок первоначального связывания, «спуститься» к инициирующему кодону и начать транскрибировать три структурных гена. *В*. Если глюкозы в среде много, то сАМР не образуется и САР поэтому не в состоянии связаться с промотором. В этих условиях РНК-полимераза не может получить доступ к промотору и *lac*-гены не транскрибируются.

разы. Если в среде отсутствует глюкоза, то в клетке формируется комплекс между САР и циклическим АМР (сАМР); этот комплекс соединяется с САР-участком ДНК и дает возможность РНК-полимеразе попасть в участок первоначального связывания. Если среда содержит лактозу, то *о*-участок открыт, поскольку оператор не может взаимодействовать с индуктор-репрессорным комплексом. В этих условиях РНК-полимераза перемещается от места своего первоначального связывания через область оператора и начинает транскрибировать три *lac*-гена. Если же в среде присутствует глюкоза, то концентрация сАМР сильно снижается и комплекс САР–сАМР не может образоваться. Короче говоря, САР-участок обеспечивает доступность участка первоначального связывания РНК-полимеразы только будучи соединенным с комплексом САР–сАМР. Поэтому, когда такой комплекс не образуется, РНК-полимераза не может связаться с промоторным участком и *lac*-гены не транскрибируются. Таким образом, транскрипция *lac*-генов возможна только при отсутствии глюкозы; следовательно, *lac*-оперон находится как под позитивным (*р*-участок), так и под негативным (*о*-участок) контролем.

Возникает естественный вопрос, как САР улавливает присутствие глюкозы? В молекуле САР есть два центра – один, как указано выше, для связывания с САР-участком промотора и второй для связывания сАМР. Вспомним, что сАМР – это внутриклеточный посредник при действии ряда гормонов в клетках позвоночных (гл. 25). У *E. coli* сАМР также служит посредником, но для другой цели: он сигнализирует о том, есть ли в ростовой среде глюкоза. Клетки *E. coli* содержат фермент аденилатциклазу (разд. 25.5), который катализирует образование сАМР из АТР; в этих клетках имеется также фосфодиэстераза, которая гидролизует сАМР и тем самым инактивирует его. Если концентрация глюкозы высока и соответствует потребностям клетки, концентрация сАМР в клетке очень мала (рис. 29-27). Однако, когда концентрация глюкозы в клетке падает, содержание в ней сАМР возрастает благодаря увеличению активности аденилатциклазы и уменьшению активности фосфодиэстеразы (разд. 25.9). Образующийся сАМР взаимодействует с САР, а комплекс САР–сАМР в свою очередь связывается с САР-участком промотора. Только в этом случае РНК-полимераза может присоединиться к месту инициации и начать синтезировать на *lac*-генах мРНК (рис. 29-27). Поэтому сАМР в бактериях получил название «сигнал голода».

Бóльшая часть нуклеотидной последовательности *lac*-оперона *E. coli* уже определена. Известна полная нуклеотидная

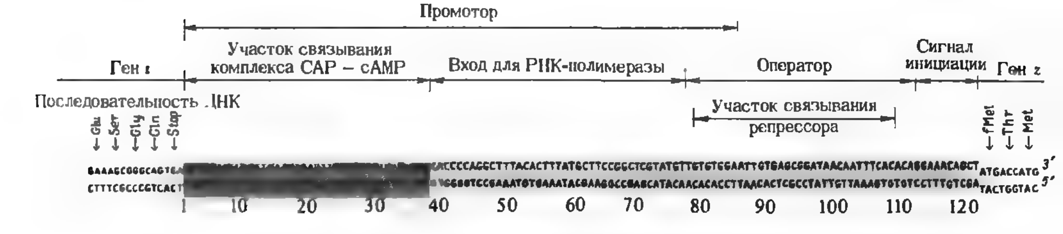


Рис. 29-28. Структура промотор-операторной области *lac*-оперона *E. coli*. Показана нуклеотидная последовательность обеих цепей ДНК, начиная с последних 15 оснований регуляторного (*i*) гена и кончая первыми девятью основаниями гена *z*. Видно, что промотор перекрывает оператор. Участок связывания комплекса CAP–cAMP состоит приблизительно из 38 оснований, а участок первоначального связывания РНК-полимеразы – приблизительно из 40 оснований. Участок связывания *lac*-репрессора в операторе содержит около 28 пар оснований и характеризуется симметрией второго порядка.

последовательность оператора и промотора. Весь промотор состоит, как оказалось, из 85 нуклеотидных пар, причем на долю САР-участка приходится около 38, а на долю участка первоначального связывания РНК-полимеразы – около 40 пар оснований (рис. 29-28).

Кроме ряда оперонов с их регуляторными генами бактерии обладают и другими механизмами регуляции белкового синтеза. Некоторые из них позволяют осуществлять регуляцию не по принципу «все или ничего», а за счет постепенной аттенуации, т.е. снижения скорости синтеза белка. Механизмы, чувствительные к концентрации аммиака или других источников азота, дают возможность бактериям приспособить свое белковое хозяйство к скудным условиям существования. Из сказанного ясно, что бактерии обладают тончайшими механизмами регуляции синтеза своих ферментов, позволяющими им оптимизировать свой метаболизм в соответствии с принципом максимальной экономии.

Краткое содержание главы

Чтобы принять участие в синтезе белка, сначала аминокислоты активируются в цитозоле с помощью специфических аминоацил-тРНК – синтетаз. Эти ферменты катализируют образование эфирной связи между аминоацильным остатком и соответствующей тРНК, сопровождающееся расщеплением АТР до АМР и пирофосфата. тРНК содержат от 73 до 93 нуклеотидных остатков, часть из которых включает модифицированные основания. Молекулы тРНК имеют в своем составе акцепторную ветвь с концевой последовательностью (3') А–С–С– (к которой эфирной связью присоединяется аминокислота), антикодоновую ветвь, TψC-ветвь и дигидроуридиловую ветвь; некоторые тРНК содержат пятую добавочную ветвь. Тройка нуклеотидов в тРНК (триплет), образующая антикодон, отвечает за специфичность взаимодействия аминоацил-тРНК с комплементарным кодоновым триплетом в мРНК. Рост полипептидной цепи на рибосомах начинается с N-концевой аминокислоты и продолжается в результате последовательного добавления новых остатков к С-концу. Прокариоты содержат 70S-рибосомы, состоящие из большой 50S- и малой 30S-субчастиц. Эукариотические рибосомы значительно крупнее и содержат больше белков, чем прокариотические.

У бактерий инициирующим N-концевым остатком во всех белках служит N-формилметионил-тРНК. Она образует комплекс с фактором инициации (IF-2), 30S-рибосомной субчастицей, мРНК и GTP; этот сложный комплекс взаимодействует с 50S-субчастицей, формируя инициирующий комплекс с одновременным расщеплением GTP до GDP и отделением IF-2. На следующих за этим этапах элонгации необходимо присутствие GTP и трех факторов элонгации, участвующих в присоединении поступающей аминоацил-тРНК к аминоацилсвязывающему участку рибосомы (А-

участку). В ходе пептидилтрансферазной реакции остаток формилметионина переносится на аминогруппу вновь поступившей аминоацил-тРНК. Удлиненная таким образом пептидил-тРНК перемещается с аминоацильного на пептидильный участок рибосомы; этот процесс требует гидролиза GTP. После многократного повторения таких циклов элонгации происходит терминация полипептидной цепи, осуществляемая с помощью так называемых рилизинг-факторов. Синтез белка происходит в полирибосомах – комплексах, состоящих из нескольких или большого числа рибосом, прикрепленных к молекуле мРНК; каждая из рибосом считывает мРНК и синтезирует белок независимо. На образование каждой пептидной связи расходуются по меньшей мере четыре высокоэнергетические фосфатные связи; вероятно, это необходимо для гарантии точности трансляции.

Кодоны для аминокислот представляют собой специфические тройки нуклеотидов (триплеты). Нуклеотидная последовательность в кодонах была установлена в результате экспериментов с использованием синтетических мРНК известного нуклеотидного состава и известной нуклеотидной последовательности. В аминокислотном коде почти каждой аминокислоте соответствует несколько кодовых слов. Третья буква каждого кодона гораздо менее специфична, чем первые две: про нее говорят, что она «качается». Стандартные слова генетического кода, вероятно, универсальны для всех организмов, правда в митохондриях человека найдены кодоны, значение которых отличается от универсального. Инициирующая аминокислота N-формилметионин кодируется кодоном AUG, причем для ее взаимодействия с этим кодоном необходимо наличие с 5'-стороны от AUG инициирующего сигнала с повышенным содержанием A и G. Триплеты UAA, UGA и UAG не кодируют никакую аминокислоту, они служат сигналами терминации полипептидной цепи. В некоторых вирусных ДНК одна и та же нуклеотидная последовательность может кодировать два разных белка, мРНК для которых транскрибируются с использованием разных рамок считывания.

Синтез белка у прокариот регулируется главным образом на уровне транскрипции ДНК, т. е. на уровне образования мРНК. Транскрипция группы метаболически связанных между собой генов регулируется путем присоединения (или отделения) особого белка – репрессора к операторному участку ДНК. Оператор и группа связанных друг с другом генов вместе составляют оперон. Транскрипция такой группы генов может индуцироваться специфическим питательным субстратом, например лактозой. Лактоза может связывать репрессор и вызывать тем самым его отделение от оператора. Благодаря этому разрешается транскрипция генов, кодирующих белки, необходимые клетке для использования лактозы в качестве источника углерода и энергии. Некоторые опероны имеют также промоторный участок, содержащий регуляторную часть – так называемый САР-участок; последний предназначен для связывания комплекса, образованного белком, активирующим катаболитный ген (САР), и cAMP. Этот комплекс, формирующийся при отсутствии в среде глюкозы, дает возможность РНК-полимеразе присоединиться к месту инициации транскрипции генов, ответственных за катаболизм лактозы.

ЛИТЕРАТУРА

Активация аминокислот

Rich A., Kim S. H. The Three-Dimensional Structure of Transfer RNA, Sci. Am., **238**, 52–62, January 1978.

Schimmel P. R. Understanding the Recognition of Transfer RNAs by Aminoacyl Transfer Synthetases, Adv. Enzymol., **49**, 187–222 (1979).

Рибосомы

Nomura M. Assembly of Bacterial Ribosomes, Science, **179**, 864–873 (1973).

Wittman H. G. Structure and Function of *E. coli* Ribosomes, Fed. Proc., **36**, 2025-2080 (1977).

Этапы инициации, элонгации и терминации белкового синтеза

Weissbach H., Pestka S. (eds.). Molecular Mecha-

nisms of Protein Biosynthesis, Academic, New York, 1977. Обзорные статьи по различным вопросам белкового синтеза.

Генетический код

Barrell B. G., Air G. M., Hutchinson C. A., III. Overlapping Genes in Bacteriophage фX174, Nature, **264**, 34–40 (1976).

Crick F. H. C. The Genetic Code III, Sci. Am., **215**, 55–62, October 1966.

Fiddes J. C. The Nucleotide Sequence of a Viral DNA, Sci. Am., **237**, 54–67, December 1977.

Hall B. D. Mitochondria Spring Surprises, Nature, **282**, 129–130 (1979). Исключения из принципа универсальности генетического кода.

Nirenberg M. The Genetic Code II, Sci. Am., **208**, 80–94, March 1963. Описание первых экспериментов по расшифровке генетического кода.

Регуляция экспрессии генов

Brown D. D. Gene Expression in Eukaryotes, Science, **211**, 667–674 (1981).

Lewin B. Gene Regulation II, 2nd ed., Wiley, New York, 1980. Книга содержит большое количество информации по проблеме регуляции у эукариот.

Maniatis T., Ptashne M. A DNA Operator-Repressor System, Sci. Am., **234**, 64–76, January 1976.

O'Malley B. W. et al. The Ovalbumin Gene: Organization, Structure, Transcription, and Regulation, Recent Progr. Horm. Res., **35**, 1–42 (1979).

Pastan I. Cyclic AMP, Sci. Am., **227**, 97–105, August 1972.

Специальные вопросы

Palade G. Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis, Science, **189**, 347–357 (1975).

Yarus M. Accuracy of Translation, Progr. Nucleic Acid Res., **23**, 195–225 (1979).

Вопросы и задачи

1. *Трансляция мРНК.* Предскажите аминокислотную последовательность пептидов, синтезируемых в рибосомах в присутствии следующих матриц, считая, что считывание начинается с первого триплета на левом конце.
   а) GGUCAGUCGCUCCUGAUU
   б) UUGGAUGCGCCAUAAUUUGCU
   в) CAUGAUGCCUGUUGCUAC
   г) AUGGACGAA
2. *Можно ли, исходя из аминокислотной последовательности полипептида, предсказать нуклеотидную последовательность его мРНК?* Данная нуклеотидная последовательность в мРНК кодирует при строго определенной рамке считывания одну и только одну последовательность аминокислот в полипептиде. Можно ли, исходя из данной последовательности аминокислотных остатков в белке, например в цитохроме *c*, предсказать нуклеотидную последовательность единственной мРНК, кодирующей этот белок? Обоснуйте ваш ответ.
3. *Сколько разных мРНК может кодировать одну аминокислотную последовательность?* В качестве дополнительной иллюстрации к рассмотренному в предыдущей задаче вопросу напишите все возможные последовательности мРНК, которые способны кодировать простой трипептид Leu–Met–Tyr. Ответив на этот вопрос, вы получите некоторое представление о числе разных мРНК, которые могут кодировать один полипептид.
4. *Кодирование полипептида двухцепочечной ДНК.* Транскрибируемая цепь двухцепочечной ДНК содержит последовательность

(5') CTTAACACCCCTGACTTCGCGCCGTCG

   а) Какая последовательность мРНК может транскрибироваться с этой цепи?
   б) Какая аминокислотная последовательность могла бы кодироваться этой последовательностью при считывании с 5'-конца?
   в) Предположим, что другая цепь этой ДНК тоже транскрибируется, а полученная мРНК транслируется. Совпадает ли полученная аминокислотная последовательность с последовательностью, которую вы привели в ответе на вопрос б)? Объясните биологическое значение ваших ответов на вопросы б) и в).
5. *Метионину соответствует только один кодон.* Метионин – одна из двух аминокислот, которым соответствует всего один кодон. Этот единственный кодон метионина может кодировать как инициирующий остаток, так и внутренние остатки метионина в полипептидах, синтезируемых *E. coli*. Объясните, каким образом это происходит.
6. *Синтетические мРНК.* Каким образом вы синтезировали бы полирибонуклеотид, который можно было бы использовать в качестве мРНК, кодирующей преимущественно остатки фенилаланина и небольшое число остатков лейцина и серина? Какие еще аминокислоты, но в гораздо мень-

ших количествах, кодировались бы таким полирибонуклеотидом?

7. *Непосредственные энергетические затраты при биосинтезе белка.* Определите минимальные энергетические затраты (в расчете на число высокоэнергетических фосфатных групп), необходимые для биосинтеза β-глобиновой цепи гемоглобина (146 остатков) из всех аминокислот, ATP и GTP. Сравните ваш ответ с расходами энергии на биосинтез линейной цепи гликогена, включающей 146 остатков глюкозы, соединенных α(1 → 4)-связью, и синтезируемой из глюкозы в присутствии ATP. Какова, исходя из ваших ответов, дополнительная энергетическая стоимость β-глобиновой молекулы, обусловленная тем, что в отличие от гликогена при ее построении необходимо реализовать определенную генетическую информацию?

8. *Непрямые затраты на синтез белка.* Наряду с непосредственными энергетическими затратами на синтез белка, рассмотренными в предыдущем вопросе, клетка производит и непрямые затраты энергии, связанные с образованием требуемых для синтеза белка биокатализаторов. Сопоставьте факторы, определяющие непрямые расходы, которые приходится нести эукариотической клетке при синтезе линейных α(1 → 4)-цепей гликогена и при биосинтезе полипептидов.

9. *Предсказание антикодонов, исходя из кодонов.* Большинству аминокислот соответствует больше чем один кодон, больше чем одна тРНК и больше чем один антикодон. Напишите все возможные антикодоны для четырех глициновых кодонов: (5′) GGU (3′), GGC, GGA и GGG.
   а) На основании вашего ответа скажите, какие из положений антикодона определяют в первую очередь его специфичность в случае глицина?
   б) Какие из кодон-антикодоновых пар содержат «качающуюся» пару оснований?
   в) В какой из кодон-антикодоновых пар все три пары оснований образованы за счет прочных уотсон-криковских водородных связей?
   г) Использование какой из кодон-антикодоновых пар в биологическом синтезе белка наименее вероятно? Почему?

10. *Необычная тРНК.* Недавно была обнаружена тРНК, антикодон которой узнает и связывает тетрануклеотидную последовательность мРНК. Предскажите, как повлияет на аминокислотную последовательность полипептида участие этой необычной тРНК в его синтезе.

11. *Как влияет изменение одного основания в мРНК на аминокислотную последовательность полипептида?* Очень важные доказательства, подтверждающие правильность расшифрованного генетического кода, были получены при изучении природы мутаций, приводящих к замене одного остатка в аминокислотной последовательности белка. Какая из перечисленных ниже замен одной аминокислоты на другую согласуется с генетическим кодом? Какая из замен не может быть результатом изменения одного-единственного основания в мРНК? Почему?
   а) Phe → Leu
   б) Lys → Ala
   в) Ala → Thr
   г) Phe → Lys
   д) Ile → Leu
   е) His → Glu
   ж) Pro → Ser

12. *Причина мутации, приводящей к образованию серповидных эритроцитов.* В гемоглобине серповидных эритроцитов в 6-м положении β-глобиновой цепи вместо глутаминовой кислоты (присутствующей в нормальном гемоглобине А) обнаружен валин. Какое изменение, произошедшее в кодоне для глутаминовой кислоты, привело к ее замене на валин?

ГЛАВА 30

ЕЩЕ О ГЕНАХ: РЕПАРАЦИЯ, МУТАЦИИ, РЕКОМБИНАЦИЯ И КЛОНИРОВАНИЕ

Хромосомы - это отнюдь не инертные, стабильные структуры, незыблемо сохраняющие генетическую информацию в исходном виде. Они постоянно претерпевают различного рода изменения. Некоторые из этих изменений носят случайный характер и легко поддаются исправлению. Например, в ходе репликации, когда цепи дуплекса расходятся и раскручиваются с большой скоростью, в ДНК могут возникать одноцепочечные разрывы. Эти разрывы восстанавливаются (репарируются) под действием ДНК-полимеразы I и ДНК-лигазы. Аналогичным образом, ошибочно встроенный нуклеотид, который не способен образовать правильную комплементарную пару, может быть вырезан и заменен благодаря корректирующей способности ДНК-полимеразы (разд. 28.14). В этой главе мы увидим, что изменения ДНК могут быть вызваны воздействием различных факторов внешней среды. Если клетка не исправляет возникшее нарушение, то это приводит к появлению наследуемого изменения – мутации.

Хромосомы претерпевают также изменения и перестройки другого рода, происходящие в процессе их нормального биологического функционирования. Слияние яйцеклетки со сперматозоидом у эукариот сопровождается генетической рекомбинацией, что приводит к появлению потомства с новой комбинацией генов. Кроме того, гены и части генов могут перемещаться из одного места хромосомы в другие. Гены могут также обмениваться и рекомбинировать при заражении клеток вирусами.

Однако, несмотря на постоянные повреждения, репарацию, обмен и перемещение генов, внутривидовая тождественность живых организмов поддерживается из поколения в поколение с исключительной точностью. Это оказывается возможным благодаря замечательной способности некоторых ферментов предохранять или восстанавливать специфические нуклеотидные последовательности ДНК в каждой из хромосом организма. Обнаружение этих ферментов позволило также осуществить в лабораторных условиях конструирование рекомбинантных, т. е. по существу новых молекул ДНК, в которых гены одного организма оказываются объединенными с генами другого. Эти достижения открыли новую эру в биохимической генетике и привели к возникновению нового научного направления – генетической инженерии.

Рассмотрим некоторые типы изменений ДНК.

30.1. В ДНК постоянно возникают повреждения

Практически все живые организмы подвергаются воздействию высокоэнергетического излучения, способного вызывать химические изменения в ДНК. *Ультрафиолетовое излучение* (с длиной волны 200–400 нм), составляющее значительную часть солнечного спектра, может вызвать химические изменения в ДНК бактерий и клеток кожного покрова человека. В результате поглощения ультрафиолетовых (УФ) лучей пуриновое или пиримидиновое основание переходит в возбужденное состояние, при

котором в структуре этого основания возможны ковалентные изменения. Под действием другого вида лучистой энергии – *ионизирующего излучения* – из биологической молекулы могут выбиваться один или несколько электронов, что приводит к образованию крайне нестабильного иона или свободного радикала. Такой продукт обладает высокой реакционной способностью и может вызвать в ДНК аномальные химические изменения. Вокруг нас постоянно существует фон ионизирующего излучения как в форме *космических лучей*, проникающих в глубинные слои земли, так и в форме излучения, испускаемого радиоактивными изотопами радия, плутония, углерода (^{14}C) и водорода (^{3}H). Еще один вид ионизирующего излучения - это *рентгеновские лучи*, используемые при медицинских обследованиях, а также при радиотерапии рака и других заболеваний. Источником ионизирующего излучения служат также радиоактивные осадки, выпадающие после испытаний ядерного оружия, и радиоактивные отходы атомных реакторов. Приблизительно 10% всех повреждений ДНК, вызываемых небиологическими факторами, происходит под действием ультрафиолетового и ионизирующего излучения. К счастью, бóльшая часть этих повреждений быстро исправляется клетками с помощью особых ферментативных механизмов.

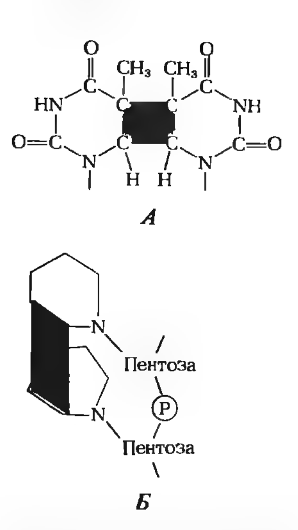


Рис. 30-1. Образование тиминового димера под действием ультрафиолетового облучения. Между двумя соседними остатками тимина, расположенными в одной цепи ДНК, образуются две новые углерод-углеродные связн (отмечены красным цветом). *А*. Структура димера изображена в плоскости, но лучше ее рассмотреть в трехмерной проекции, как она показана на рис. *Б*, где четырехчленное кольцо, образованное двумя новыми связями, закрашено.

30.2. Участки, поврежденные под действием ультрафиолетового излучения, могут быть вырезаны и исправлены

Под действием ультрафиолетового излучения между двумя соседними пиримидиновыми остатками (чаще всего это два соседних тимина) в бактериальной ДНК может возникать ковалентная связь, в результате чего образуется *димер* (рис. 30-1). Если не устранить повреждение и не восстановить нормальную структуру ДНК, то образовавшийся тиминовый димер может оказаться непреодолимым препятствием для ДНК-полимеразы при репликации той части цепи, которая находится за димером. В действительности в клетке существует механизм устранения повреждения (репарации). Тиминовые димеры вырезаются, и брешь заделывается в результате последовательного участия четырех ферментов (рис. 30-2). Первый из них, называемый *УФ-эндонуклеазой*, расщепляет поврежденную цепь с 5'-стороны от тиминового димера. Второй фермент – ДНК-полимераза I – достраивает к открытому 3'-концу этой цепи соответствующие дезоксирибонуклеотиды, образуя короткий отрезок ДНК, комплементарный матричной цепи. В ходе этого синтеза цепь, содержащая тиминовый димер, вытесняется. На третьей стадии эндонуклеаза вырезает дефектный участок. И, наконец, на четвертой под действием ДНК-лигазы происходит присоединение «заплатки» новосинтезированной комплементарной ДНК к разорванной цепи (рис. 30-2).

Пиримидиновые димеры возникают и репарируются не только в УФ-облу-

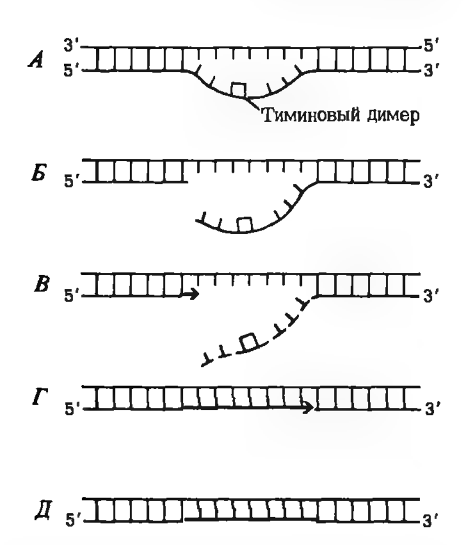


Рис. 30-2. *А*. Репарация тиминового димера. *Б*. Особая УФ-эндонуклеаза расщепляет дефектную цепь с 5'-стороны от димера. *В*. ДНК-полимераза I начинает «латать» цепь, а 5' → 3'-эндонуклеаза удаляет тиминовый димер и несколько прилежащих к нему нуклеотидов. *Г*. Новый участок ДНК достроен. *Д*. Соединение нового участка с основной цепью под действием ДНК-лигазы.

ченных бактериях, но и в клетках кожи людей, подвергшихся действию открытого солнечного света. Однако при *пигментной ксеродерме* – редком заболевании человека, механизм ферментативной репарации ультрафиолетовых повреждений генетически нарушен. В этих условиях кожа оказывается чрезвычайно чувствительной к солнечному свету. Она становится очень сухой и тонкой, пролиферация клеток кожи протекает ненормально, и у лиц с подобными признаками почти всегда развивается рак кожи. Кожу таких больных следует тщательно предохранять от попадания солнечного света. В противном случае эта болезнь часто приводит к летальному исходу. В результате биохимических и генетических исследований удалось выяснить, что в случае наиболее распространенной формы пигментной ксеродермы нарушение затрагивает УФ-эндонуклеазу – фермент, образующий разрыв дефектной цепи с 5'-стороны от пиримидинового димера. Из-за повреждения всего лишь одного-единственного фермента облучение кожи солнечным светом может привести к летальному исходу.

Ультрафиолетовая часть спектра солнечного света, вызывающая пигментацию кожи (загар), не проходит сквозь стекло и через разного рода солнцезащитные материалы, которые содержат химические соединения, поглощающие ультрафиолет.

30.3. Спонтанное дезаминирование цитозина с образованием урацила может быть исправлено

В ДНК могут также происходить изменения, обусловленные химической лабильностью цитозина в водной среде. Остатки цитозина очень медленно самопроизвольно теряют свою аминогруппу в результате гидролиза и превращаются в остатки урацила, которые обычно отсутствуют в ДНК (рис. 30-3). Если цепь ДНК, содержащая остаток урацила, реплицируется, то урацил оказывается не в состоянии образовать достаточно прочные водородные связи с остатком гуанина (G), который служит нормальным партнером цитозина. Вместо этого урацил стремится к образованию пары с аденином. Когда новая цепь ДНК, несущая в своем составе неправильный остаток А, в свою очередь реплицируется, то в комплементарной цепи на этом месте появляется, естественно, Т. В результате дочерняя двухцепочечная ДНК будет содержать пару А – Т в том положении, где в исходной родительской ДНК до повреждения находилась пара G – С.

Репарация этого вида повреждений осуществляется весьма оригинальным путем (рис. 30-4). Сначала особый репарирующий фермент – *урацил-ДНК – гликозидаза* – удаляет с помощью гидролиза неправильное основание, т. е. урацил из поврежденной цепи, после чего фосфодиэфирная связь с 5'-стороны от потерявшего основание дезоксирибозофосфатного остатка расщепляется ДНК-полимеразой I. Далее ДНК-полимераза I присоединяет в это место к открывшемуся 3'-концу репарируемой цепи правильный

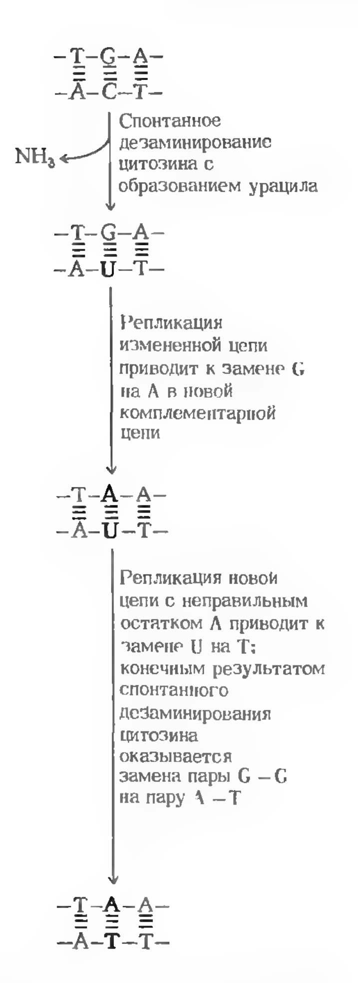


Рис. 30-3. Спонтанное превращение цитозина ДНК в урацил; такое изменение, если его не исправить, может вызвать мутацию.

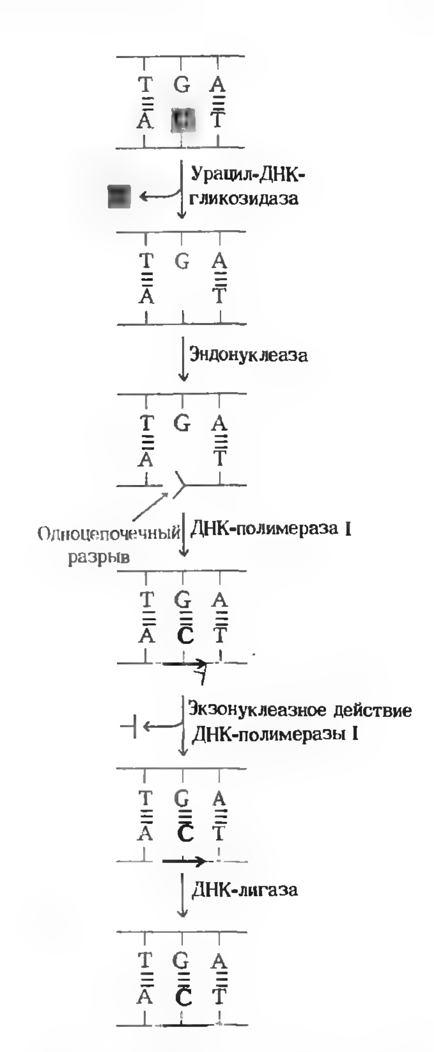


Рис. 30-4. Репарация спонтанного превращения цитозина в урацил. Урацил может быть удален при помощи ферментов, после чего лишенный основания дезоксирибозофосфат замещается на правильный остаток дезоксицитидинфосфата.

остаток цитидина, который образует комплементарную пару с гуаниловым остатком, находящимся в неповрежденной цепи. Завершает репарацию ДНК-лигаза, которая ковалентно сшивает исправленную цепь.

Гликозидаза, удаляющая из ДНК урацил, должна обладать высокой специфичностью; в противном случае она бы принесла гораздо больше вреда, нежели пользы. К счастью, этот фермент действительно не выщепляет урацил из РНК и не вырезает тимин из ДНК. Это обстоятельство позволяет высказать предположение, которое может помочь понять, почему ДНК вместо урацила содержит тимин. Все дело в том, что если бы в состав нормальной ДНК входил и цитозин, и урацил, то отличить остатки урацила, исходно присутствовавшие в ДНК, от остатков урацила, появившихся в результате спонтанного дезаминирования цитозина, было бы невозможно; и только потому, что ДНК в норме содержит не урацил, а тимин, система репарации может узнавать и удалять остатки урацила, образовавшиеся при спонтанном гидролизе цитозина.

30.4. Повреждение, вызываемое химическими агентами окружающей среды, также может быть исправлено

Повреждения в ДНК могут вызываться также активными химическими соединениями окружающей среды, представляющими собой продукты промышленной деятельности человека. Сами по себе эти вещества могут и не быть вредными, но в процессе метаболизма они могут превращаться в опасные для клеток соединения. Различают три основных типа таких химических агентов: 1) *дезаминирующие агенты* – главным образом азотистая кислота (HNO_2) или вещества, которые могут в процессе метаболизма привести к образованию азотистой кислоты или нитритов, 2) алкилирующие агенты и 3) соединения, которые из-за своего сходства с нормальными основаниями ДНК могут подменять их в молекуле (рис. 30-5).

Азотистая кислота, образующаяся из органических предшественников, например из нитрозаминов, а также из нитритов и нитратов, представляет собой соединение, способное очень эффективно удалять аминогруппы *цитозина, аденина* и *гуанина* (рис. 30-6). Азотистая кислота сильно ускоряет процесс дезаминирования цитозина, приводящий к появлению в составе ДНК урацила; этот тип повреждений мы уже рассматривали выше. Аналогичным образом, в результате дезаминирования под действием азотистой кислоты из аденина образуется *гипоксантин*, а из гуанина – *ксантин* (рис. 30-6). Появившиеся в ДНК остатки гипоксантина и ксантина выявляются и удаляются при помощи специфических ферментов, после чего репарацию продолжают ДНК-полимераза I и ДНК-лигаза; суть этого процесса показана на рис. 30-4 на примере удаления остатков урацила. Нитраты и нитриты добавляют в качестве консервантов в колбасу, сосиски и другие мясные продукты; однако нет единого мнения относительно того, являются ли они совершенно безвредными для человека. Другие предшественники азотистой кислоты широко используются в промышленности.

Определенные основания в ДНК могут подвергаться изменениям под действием алкилирующих агентов; например, диметилсульфат (рис. 30-5), обладающий высокой реакционной способностью, метилирует остатки гуанина. В результате образуется О-метилгуанин (рис. 30-7), который не способен спариваться с обычным партнером гуанина цитозином. Как у бактерии, так и в животных тканях имеются ферменты, которые специфически удаляют О-метилгуанин и заменяют его на нормальный гуанин. И в этом случае репарация осуществляется по механизму «разрезал – залатал – зашил», сходному с тем, который показан на рис. 30-4.

Было обнаружено множество других вариантов репарации ДНК, но и приведенных примеров достаточно, чтобы по-

А Предшественники азотистой кислоты

$NaNO_2$ Нитрит натрия

$NaNO_3$ Нитрат натрия

$R_1R_2N{-}N{=}O$ Нитрозамины

Б Алкилирующие агенты

Диметилсульфат

Диметилнитрозамин

Азотистый иприт

В Аналоги оснований

5-бромурацил

2-аминопурин

Рис. 30-5. Некоторые химические агенты, способные изменять структуру пуриновых или пиримидиновых оснований ДНК. Такие соединения называются мутагенами, поскольку последствия их действия, если они не исправлены, могут вызвать постоянные наследуемые изменения. *А.* Наиболее активный дезаминирующий агент – азотистая кислота, которая может образовываться из различных предшественников. *Б.* Алкилирующие агенты воздействуют на основания, осуществляя перенос алкильной группы на реакционноспособный атом кислорода или азота и изменяя тем самым комплементарные свойства основания. *В.* Аналоги оснований вызывают мутации, замещая нормальные основания в процессе синтеза ДНК, что приводит к неправильному спариванию оснований. Токсичные или аномальные группы показаны красным цветом.

Рис. 30-6. Усиление процесса дезаминирования оснований ДНК под действием HNO_2. Удаляемая аминогруппа отмечена красным цветом. R означает оставшуюся часть дезоксирибонуклеотида. С удалением аминогрупп изменяется способность оснований к образованию водородных связей.

Рис. 30-7. Метилирование гуанина (енольная форма) с помощью активного метилирующего агента. В результате метилирования изменяется способность гуанина к правильному спариванию с комплементарным основанием, что приводит к возникновению ошибочной пары оснований.

казать, как специфические репарирующие ферменты помогают сохранять идентичность хромосом из каждого вида организмов. В клетках присутствует много ферментов, способных исправлять повреждения в ДНК, однако нет ферментов, которые могли бы репарировать поврежденную РНК. По-видимому, это можно попытаться объяснить тем, что сохранение нуклеотидной последовательности ДНК жизненно необходимо для сохранения всего вида, тогда как сохранение нуклеотидной последовательности РНК существенно лишь для той клетки, в которой оказалась поврежденная или неправильно синтезированная молекула РНК.

30.5. Изменение одной пары оснований вызывает точковую мутацию

Несмотря на эффективность механизмов коррекции и репарации ДНК, часть повреждений или ошибок при репликации ДНК остается все же неисправленной. Это в свою очередь приводит к изменениям в геноме организма, которые могут сохраняться и наследоваться. Постоянные изменения, передающиеся по наследству в процессе репликации, называются *мутациями*.

Мутации, обусловленные заменой одного-единственного основания, называются мутациями *замещения*. При такой мутации изменение происходит лишь в одном кодоне затронутого гена. Следовательно, подобная мутация может выражаться в замене одной аминокислоты на другую в полипептиде, кодируемом этим геном, тогда как последовательность аминокислот в полипептиде может сохраняться. Примеры точковых мутаций и их последствий приведены в табл. 30-1. Часто замена одной аминокислоты на другую не приводит к значительным изменениям в биологических свойствах продукта трансляции – белка. Такие замены называют *«молчащими» мутациями*. В других же случаях замененная аминокислота может оказаться очень важной, и без нее белок оказывается полностью лишенным способности

Таблица 30-1. Влияние некоторых гипотетических точковых мутаций замещения на биологическую активность конечного белкового продукта

Мутация		Триплет дикого типа	Измененный триплет
Замена одного основания, не приводящая к изменениям в аминокислотной последовательности: «молчащая» мутация	Матрица ДНК Кодон РНК Аминокислота	(3′)–GGT–(5′) (5′)–CCA–(3′) –Pro–	–GGA– –CCU– –**Pro**–
Замена одного основания, приводящая к замене аминокислоты, которая может не повлиять на биологическую активность белка, поскольку измененная аминокислота находится не в критическом месте белка и к тому же напоминает нормальную аминокислоту; тоже «молчащая» мутация		(3′)–TAA–(5′) (5′)–AUU–(3′) –Ile–	–GAA– –CUU– –**Leu**–
Летальная точковая мутация замещения, при которой необходимый для проявления ферментативной активности остаток серина заменяется на фенилаланин, что приводит к образованию неактивного фермента		(3′)–AGA–(5′) (5′)–UCU–(3′) –Ser–	–AAA– –UUU– –**Phe**–
Мутация, неполностью подавляющая функцию, при которой замена аминокислоты приводит к образованию белка, частично сохраняющего свою ферментативную активность		(3′)–CGT–(5′) (5′)–GCA–(3′) –Ala–	–CCT– –GGA– –**Gly**–
Гипотетическая благоприятная мутация, при которой замена аминокислоты приводит к образованию белка с улучшенной биологической активностью, дающей мутантному организму какое-либо преимущество; предсказать благоприятную замену аминокислоты невозможно		(3′)–TTC–(5′) (5′)–AAG–(3′) –Lys–	–TCC– –AGG– –**Arg**–

выполнять свою нормальную биологическую функцию. Такие мутации часто бывают летальными для клеток. Например, точковая мутация в кодоне специфического остатка серина, являющегося важнейшим компонентом активного центра фермента (группу таких ферментов называют сериновыми ферментами; см. разд. 9.12; табл. 30-1), приводит к полной потере активности этого фермента. Если этот фермент участвует в реакциях главного метаболического пути, то такая мутация может стать летальной.

Может также случиться, что, несмотря на происшедшую замену аминокислоты, мутантный белок сохранит способность выполнять свою функцию, но будет отличаться от нормального белка по своим свойствам и потому окажется не столь эффективным, как нормальный белок. Например, если мутации подвергся фермент, то он может иметь более высокое

значение K_M, более низкое значение V_{max} или и то и другое одновременно. Мутанты, которые синтезируют такие измененные, но все же частично функционирующие белки, называются *мутантами с неполностью подавленной функцией*, или *leaky-мутантами* (табл. 30-1). Иногда в результате мутации полипептидный продукт гена может стать лучше приспособленным к выполнению своей функции в тех особых условиях, в которые попал организм. Такие мутации дают потомству преимущества в борьбе за существование, и серия соответствующих мутаций может привести к появлению нового вида.

Точковые мутации замещения составляют лишь малую часть мутаций, характерных для бактерий. Более многочисленными и более опасными для клеток являются мутации, связанные с *вставками* и *делециями* нуклеотидов.

30.6. Вставки и делеции нуклеотидов вызывают мутации со сдвигом рамки

Если мутация обусловлена вставкой или делецией одной нуклеотидной пары в гене, то при этом могут происходить более глубокие генетические повреждения, чем в случае замены основания. Следствием подобной мутации будет нарушение нормального соответствия между кодонами в ДНК и аминокислотами в кодируемом полипептиде. Нарушения начнутся с той точки, в которой появилась или исчезла пара оснований, поскольку именно в этом месте возникает сдвиг рамки считывания ДНК. В результате полипептидный продукт будет иметь правильную аминокислотную последовательность вплоть до точки мутации, а далее аминокислотная последовательность будет совершенно искажена (рис. 30-8). Мутации со сдвигом рамки часто приводят к появлению внутреннего терминирующего кодона, вызывающего преждевременное прекращение синтеза полипептида и образование укороченного продукта. Подавляющее большинство точковых мутаций со сдвигом рамки приводит к образованию биологически

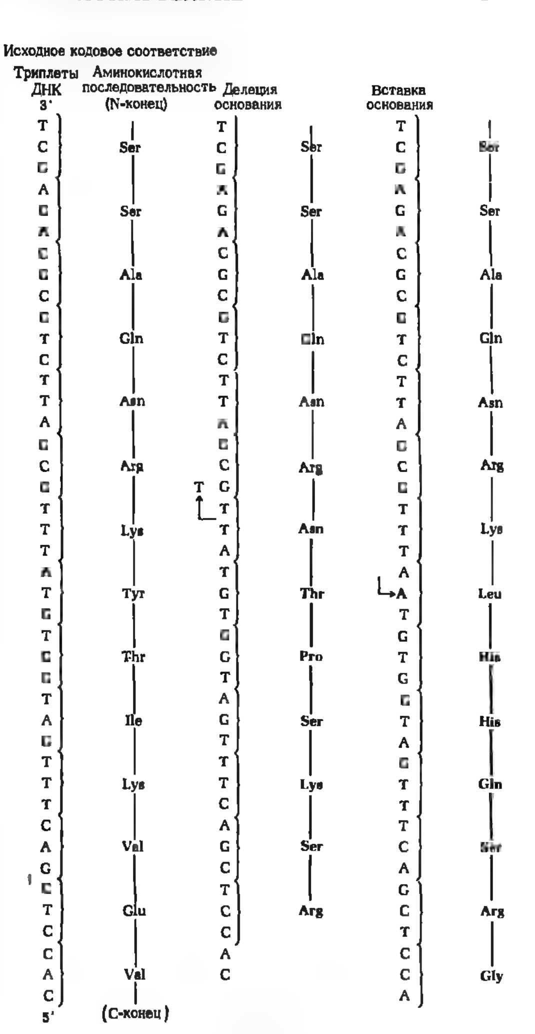


Рис. 30-8. Мутации со сдвигом рамки вызываются делецией или вставкой основания (показаны красными стрелками). Начиная с кодона, в котором потеряно или приобретено основание, аминокислотная последовательность будет полностью искажена (изображена красным цветом). Большинство мутаций со сдвигом рамки летальны.

неактивных генных продуктов.

Иногда одна мутация со сдвигом рамки может быть компенсирована другой такой же мутацией. Если первая из этих мутаций вызвана потерей одной пары оснований, то вторая мутация в том же гене, обусловленная приобретением одной пары оснований и расположенная вслед за первой мутацией, позволит восстановить правильную рамку считыва-

ния последовательности, лежащей за точкой второй мутации. В таком случае вторая мутация супрессирует, т.е. подавляет проявление первой, и потому называется *супрессорной*. Иногда, хотя и крайне редко, теряется или приобретается группа из трех следующих друг за другом оснований. При этом в образующемся полипептидном продукте в данной точке окажется пропущенной (или, наоборот, дополнительной) какая-то аминокислота, тогда как вся остальная аминокислотная последовательность будет правильной. Такие мутации обычно не приносят особого вреда. Мутации со сдвигом рамки, супрессорные мутации и мутации одновременно по трем основаниям сыграли в свое время важную роль в установлении триплетности генетического кода.

N

Рис. 30-9. Акридин – мутаген, вызывающий мутации со сдвигом рамки. Молекула акридина плоская, и ее кольцевая структура отчасти напоминает пуриновое основание. Акридин встраивается между двумя соседними парами оснований ДНК, слегка раздвигая их. При репликации ДНК в новую цепь напротив акридина включается дополнительное основание.

Мутации со сдвигом рамки могут индуцироваться некоторыми большими плоскими молекулами, которые похожи на обычные основания или на пары оснований. Такие молекулы способны *интеркалировать* (т.е. встраиваться) между двумя соседними парами оснований, в результате чего в ДНК появляется дополнительное основание. При репликации такой измененной цепи в дочернюю цепь в результате ошибочного спаривания с интеркалированной молекулой может встроиться дополнительное основание. К таким интеркалирующим мутагенам относится, в частности, *акридин* (рис. 30-9).

30.7. Мутации – это случайные, редкие события в жизни индивидуумов

Мутации в реальной жизни индивидуального организма – события весьма редкие. Вероятность того, что в течение жизни одной клетки *E. coli* произойдет мутация, составляет 10^{-9}. Для клетки человека такая вероятность выше – порядка 10^{-5}; эта величина была рассчитана, исходя из частоты встречаемости *гемофилии* – генетической болезни, в основе которой лежит нарушение механизма свертывания крови, приводящее к длительным кровотечениям. Гемофилия была одним из первых наследственных заболеваний человека, природу которого удалось понять. Классический пример этого заболевания представляет собой гемофилия в семье английской королевы Виктории. Она была прослежена в трех поколениях ее потомков, принадлежащих к королевским семьям Англии, Пруссии, Испании, Греции и России. У человека наряду с «молчащими», безвредными или благоприятными мутациями, не вызывающими осложнений, возможны мутации, приводящие к генетически наследуемым расстройствам, которые проявляются в нарушениях нормальных функций организма. К настоящему времени у человека найдены мутации примерно в 2500 различных генах; многие из них либо ухудшают те или иные функции, либо приводят в конечном счете к летальному исходу. Остальные гены человека, подверженные мутациям, предстоит обнаружить. Очевидно, число выявленных наследственных заболеваний человека будет возрастать по мере появления методов, способных регистрировать последствия мутаций. Наследственные болезни ставят перед биохимией и медициной исключительно важную задачу по их распознаванию и лечению.

30.8. Многие мутагены вызывают рак

Статистические данные убедительно свидетельствуют о том, что продолжительное воздействие на человека опреде-

ленных химических агентов (особенно если он ежедневно имеет с ними дело на работе) приводит к увеличению заболеваемости специфическими формами рака. Например, среди рабочих химической промышленности, использующих или производящих нафтиламины, гораздо чаще, чем в других группах населения, встречается рак мочевого музыря. Действительно, было подсчитано, что до 90% заболеваний раком у человека обусловлено действием вредных химических и физических агентов, способствующих трансформации нормальной клетки в злокачественную. По этой причине многие высказывают беспокойство по поводу возможного канцерогенного эффекта промышленных химических соединений, пищевых добавок, автомобильных выхлопных газов, красителей, специй, лекарственных препаратов, косметических средств и прочих химических веществ, с которыми мы постоянно сталкиваемся в повседневной жизни. В настоящее время предпринимается много усилий, чтобы оценить возможную канцерогенность перечисленных выше агентов. Задача эта трудная, ибо подсчитано, что сейчас для получения множества различных продуктов используется по меньшей мере 50000 химических соединений. И каждый год их число возрастает на 1000 и больше. Следует при этом иметь в виду, что проверка токсичности и канцерогенности только одного химического соединения на экспериментальных животных занимает 2–3 года и стоит около 100000 долл. Таким образом, проверку на животных канцерогенного эффекта всех химических агентов, воздействию которых человек подвергается все в большей степени, осуществить практически невозможно.

Простой тест на канцерогенность предложили Брюс Эймс и его сотрудники из Калифорнийского университета. Затраты на него невелики, и выполнить его можно менее чем за день. В основе предложенного теста лежит предположение, что канцерогенные агенты являются одновременно и мутагенами. Для теста используется ауксотрофный по гистидину мутант широко распространенной бактерии *Salmonella typhimurium*. Этот мутант не способен синтезировать гистидин из-за генетического нарушения одного из ферментов пути биосинтеза этой аминокислоты. Однако время от времени в таком ауксотрофном по гистидину мутанте самопроизвольно возникают обратные мутации, в результате которых бактерия вновь обретает исходную способность синтезировать гистидин из нормальных предшественников. Такие мутанты легко обнаружить, поскольку они могут расти на среде, содержащей в качестве источника азота аммиак, а не гистидин (рис. 30-10). Частота обратных мутаций заметно увеличивается под действием мутагенов, и она может служить критерием относительной мутагенной эффективности различных соединений, проверяемых на канцерогенность. В этих тестах используют лишенную гистидина питательную среду, в которую добавляют экстракт из печени крыс, содержащий ферменты эндоплазматического ретикулума, способные гидроксилировать или каким-либо иным путем превращать многие чужеродные органические вещества в конечную канцерогенную форму.

При помощи теста Эймса было проверено свыше 300 химических соединений, канцерогенность которых была достоверно установлена ранее в опытах на животных. Более 90% из них оказались мутагенами в бактериальном тесте. Столь высокая степень корреляции между канцерогенностью и мутагенностью свидетельствует о том, что по бактериальному тесту можно надежно предсказывать канцерогенный эффект. Испытанию по методу Эймса было подвергнуто почти 3000 различных химических соединений, в том числе промышленные химикаты, консерванты пищевых продуктов, пестициды, вкусовые добавки, синтетические полимеры и мономеры, а также косметические средства. Большинство этих веществ оказались мутагенами. Обнаружилось, например, что 90% красителей для волос, проданных в США и уже использованных десятками миллионов людей, представляют собой мутагены. После этого состав косметических препаратов был изменен и удалось лишить их мутагенных

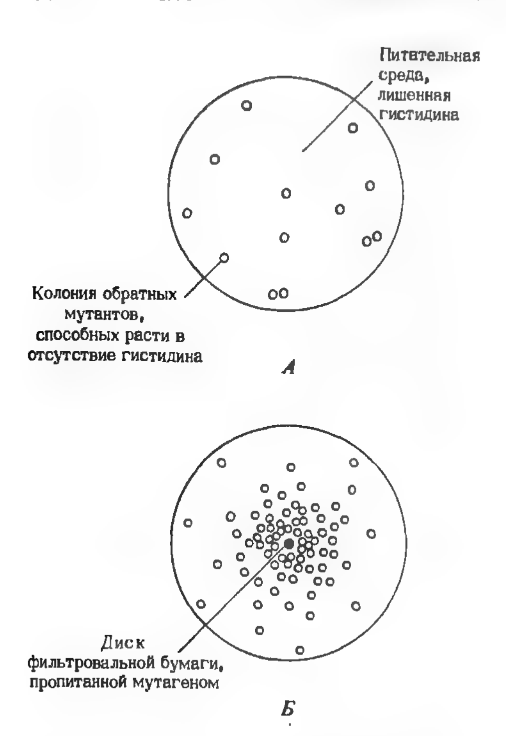


Рис. 30-10. Тест Эймса по определению канцерогенов, основанный на их мутагенной активности. *А*. При выращивании ауксотрофного по гистидину штамма *Salmonella typhimurium* на среде, лишенной гистидина, в результате обратных мутаций выросло несколько мелких колоний. *Б*. На идентичную питательную среду, зараженную таким же количеством клеток, был помещен диск фильтровальной бумаги, пропитанный мутагеном (показан красным цветом), который сильно повышает частоту обратных мутаций и соответственно число образовавшихся колоний. В зоне, прилегающей к диску, концентрация мутагена настолько высока, что оказывается летальной для клеток. По мере диффузии мутагена от центра к периферии мутаген разбавляется, его концентрация становится менее опасной и создаются условия для возникновения обратных мутаций. Мутагены сравнивают по вызываемому ими увеличению частоты мутаций.

свойств. В настоящее время для проверки химических продуктов на возможную канцерогенность широко применяется несколько разных модификаций метода Эймса.

30.9. Гены часто претерпевают рекомбинацию

До настоящего момента мы обсуждали такие изменения генов, которые возникают самопроизвольно, случайно или под действием факторов окружающей среды. Рассмотрим теперь изменения в генах и хромосомах, представляющие собой нормальные события в жизни клеток.

Нормальный биологический обмен между генами или объединение генов из разных источников с образованием измененной хромосомы, способной после этого реплицироваться, транскрибироваться и транслироваться, называется *генетической рекомбинацией*. Она встречается в различных биологических ситуациях. Мы уже детально познакомились с одним типом генетической рекомбинации – с *трансформацией* бактерий под действием экзогенной ДНК, которая имела место в классическом эксперименте Эвери, Мак-Леода и Мак-Карти (рис. 27-6). Напомним, что в этом эксперименте ДНК из вирулентного штамма пневмококка попадала в клетки невирулентного штамма и превращала этот штамм в вирулентный. Очевидно, ген вирулентности, присутствующий в ДНК донорной клетки, включается в геном реципиентной клетки. Такая трансформация бактериальных клеток, реализуемая вследствие рекомбинации генов, может наблюдаться не только в лаборатории, но и в естественных условиях.

Другим протекающим в природе процессом генетической рекомбинации является *лизогения*. При заражении бактериальной клетки определенными видами фагов ДНК этих фагов могут ковалентным образом встраиваться в кольцевую хромосому клетки-хозяина вместо того, чтобы сразу приступить к образованию дочерних фаговых частиц с последующим лизисом клеток, как это бывает в случае обычной фаговой инфекции. Встроившись в хромосому клетки-хозяина, фаговый геном может реплицироваться в ее составе в течение многих поколений, не проявляя себя в форме новых фаговых частиц. Однако спустя некото-

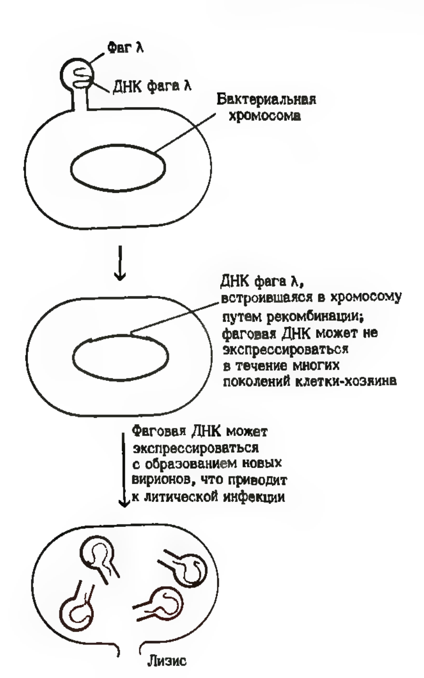


Рис. 30-11. Встраивание ДНК фага λ в хромосому *E. coli* в неэкспрессируемом состоянии, которое может поддерживаться посредством репликации в течение многих поколений. В результате некоего события, играющего роль пускового механизма, вирусный геном может начать экспрессироваться с образованием фаговых частиц и последующим лизисом клеток.

рое время какое-нибудь событие может «включить» механизм экспрессии этих «спящих» фаговых генов, в результате чего начнется образование фаговых частиц и наступит лизис клетки-хозяина (рис. 30-11). Фаги, ДНК которых может встраиваться в хромосому клетки-хозяина и существовать там в неэкпрессируемом виде, называются *умеренными*, или *лизогенизирующими фагами.* Наиболее известный умеренный фаг – это фаг λ; его включение в хромосому *E. coli* изучено очень подробно. Считается, что такой же тип генетической рекомбинации имеет место при заражении человека *вирусом простого герпеса*, который вызывает герпетическую лихорадку, а также воспаление и язвы половых органов. ДНК вируса простого герпеса способна встраиваться в геном клеток человека и находиться там в бездействии до тех пор, пока какое-нибудь событие не «включит» механизм образования инфекционных вирусных частиц.

Еще одним типом генетической рекомбинации является *трансдукция* (рис. 30-12). Если бактериальная клетка заражена некоторыми ДНК-содержащими фагами, то небольшая часть ее хромосомы может ковалентно присоединиться к фаговой ДНК, реплицироваться вместе с ней и таким образом встраиваться в ДНК дочерних фаговых частиц. Когда такие частицы заражают другую клетку, фаговая ДНК приносит в эту клетку участок хромосомы первой клетки. Трансдукция (что означает «перенос») – это природный процесс, который в лабораторных условиях используется для картирования бактериальных хромосом.



Рис. 30-12. Генетическая рекомбинация в ходе вирусной трансдукции бактериальных генов в реципиентную клетку.

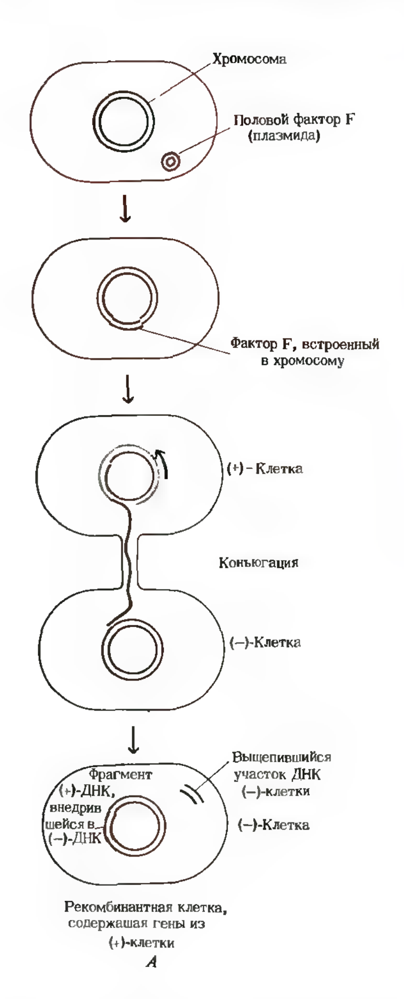




Рис. 30-13. *А*. Перенос и рекомбинация генов в процессе конъюгации бактерий. ДНК (+)-клетки реплицируется по механизму «катящегося кольца», и образующаяся одиночная цепь, содержащая фактор F, вводится в (−)-клетку. *Б*. Электронная микрофотография конъюгирующих клеток *E. coli*. (+)-Клетка, расположенная в верхней части микрофотографии, соединена с (−)-клеткой с помощью одного длинного пиля.

Другим примером генетической рекомбинации служит *конъюгация бактерий*. Обычно бактерии размножаются вегетативным путем, с помощью простого роста и деления. Однако у некоторых видов бактерий время от времени происходит половая конъюгация. В процессе такой конъюгации часть одной из цепей (или вся цепь) хромосомы донорной клетки переносится через пиль – длинный соединительный канал – в реципиентную клетку того же вида (рис. 30-13). Донорная клетка обозначается как F^+-, или (+)-клетка, так как она несет половой фактор F; реципиентная клетка, не содержащая F-фактора, называется (−)- клеткой. В результате половой конъюгации реципиентная клетка приобретает несколько новых генов, которые встраиваются в ее хромосому.

У эукариотических организмов генетическая рекомбинация осуществляется при половом слиянии яйцеклетки и сперматозоида: появляющиеся в потомстве клетки содержат дочерние хромосомы, состоящие из определенных генов обеих родительских хромосом (рис. 30-14). В этом процессе хромосомы сперматозоида и яйцеклетки расщепляются в гомологичных точках, а затем куски хромосом двух родительских клеток обмениваются своими генами и соединяются с образованием новых комбинаций генов. В результате потомство слившихся клеток обладает комбинацией фенотипических признаков, принадлежавших обоим родителям. Этот природный процесс расщепления, сборки и соединения генов

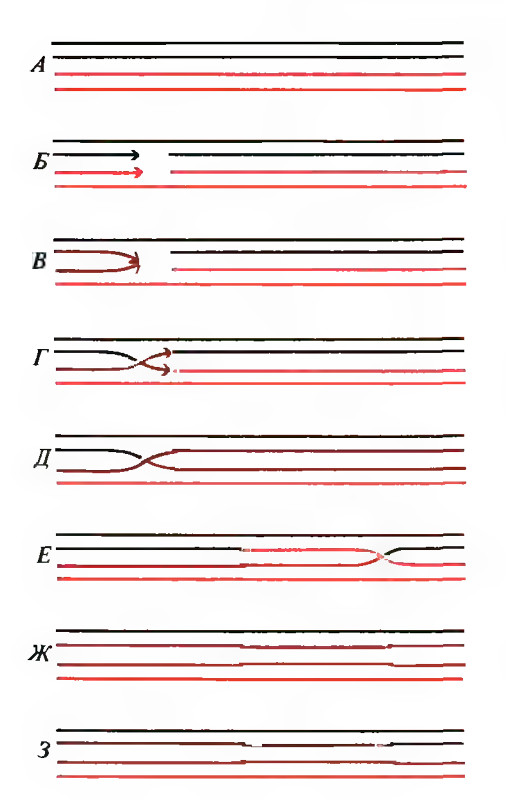


Рис. 30-14. Схематическое изображение рекомбинации генов между двумя гомологичными родительскими ДНК [они показаны на рис. (*А*) красным и черным цветом], согласно модели «одноцепочечного переключения». Одна цепь каждой из ДНК расщепляется (*Б*), «переключается» на другую ДНК (*В*, *Г*) и присоединяется к противоположной расщепленной цепи (*Д*). Обмен цепями между молекулами ДНК распространяется вдоль хромосомы (*Е*) до определенной точки, в которой вновь происходит расщепление цепей (*Ж*) и их обратное «переключение» (*З*), т. е. рекомбинация завершается.

и наборов генов в ходе половой конъюгации эукариот протекает с высокой точностью, без нарушения рамки считывания и сигнальных последовательностей в ДНК.

30.10. Участки хромосомы часто перемещаются

Хромосомы могут претерпевать разного рода биологические изменения. С помощью биохимических и генетических методов показано, что отдельные гены или группы генов прокариотических и эукариотических хромосом часто покидают свою исходную позицию и перемещаются в какое-нибудь другое место генома. Такие подвижные генетические элементы называются *перемещающимися элементами*, или *транспозонами* (от англ. transpose – перемещать). Способность транспозонов встраиваться в различные участки ДНК обусловлена короткими отрезками на обоих концах транспозона, которые называются *инсерционными последовательностями*, или *IS-элементами* (рис. 30-15). Транспозон и две его инсерционные последовательности, которые содержат обращенные последовательности оснований, могут внедряться в различные участки хромосом и плазмид при помощи особой ферментной системы, узнающей последовательности и пришивающей транспозон в новое место. Таким путем ген или набор генов может перемещаться с места на место в пределах одной и той же хромосомы, из плазмиды или фага в бактериальную хромосому либо из плазмиды в фаг.

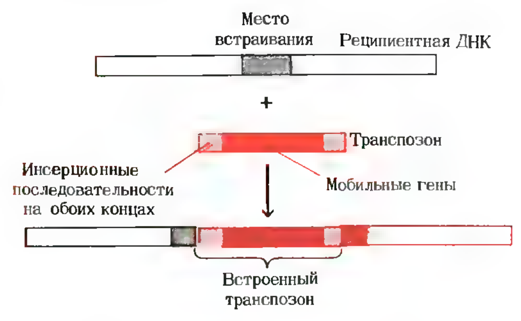


Рис. 30-15. Встраивание транспозона в реципиентную ДНК. На обоих концах транспозона расположены обращенные встраивающиеся последовательности (IS-элементы).

30.11. Разнообразие антител – это результат перемещений и рекомбинаций

Один из наиболее необычных типов генетической рекомбинации наблюдается в процессе образования генов, которые определяют синтез различных антител у позвоночных. Антитела или иммуно-

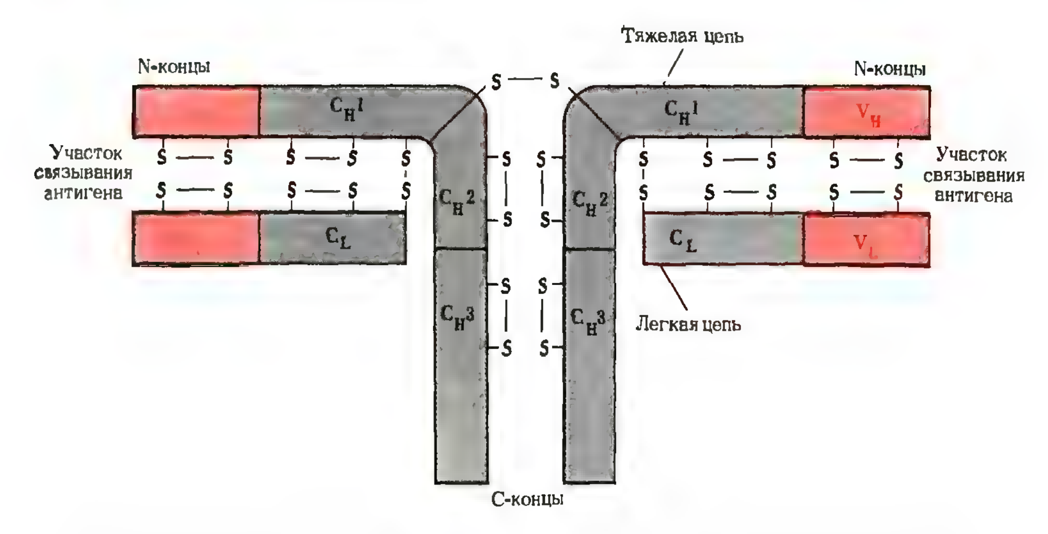


Рис. 30-16. Структура молекулы антитела. Молекула содержит две легкие (L) и две тяжелые (H) цепи, каждая из которых имеет вариабельную (V) (красная) и константную (C) области (серая). Константные области тяжелых цепей состоят из трех различающихся доменов C_H1, C_H2 и C_H3. Молекула содержит большое число дисульфидных мостиков и углеводных остатков, прикрепленных к тяжелым цепям.

глобулины – это белки, продуцируемые лимфоцитами (иммуноцитами) позвоночных в ответ на вторжение в организм чужеродной макромолекулы – *антигена* (разд. 6.11). Каждый тип антигена способен связываться с иммуноцитами одного специфического типа, вызывая рост и деление этих клеток и приводя к образованию уникального *клона*, т. е. линии полностью идентичных иммуноцитов. Клетки такого клона вырабатывают только один вид иммуноглобулинов, специфически связывающих только тот антиген, который индуцировал их размножение. В результате взаимодействия антигена с антителом образуется комплекс, в котором антиген обычно утрачивает свою биологическую активность. Удивительным является тот факт, что человеческий организм умеет синтезировать буквально миллионы разных видов антител, каждый из которых способен связываться только с одним из миллионов различных антигенов, воздействию которых организм может подвергнуться. Антитела образуются не только против большинства белков других животных, бактерий, вирусов, паразитов и растений, но практически против любой макромолекулы, даже искусственного происхождения.

Может создаться впечатление, что для того, чтобы иметь возможность синтезировать различные антитела, каждое из которых взаимодействует лишь с одним из многих миллионов возможных антигенов, организм должен содержать соответствующее число разных генов для каждого из возможных антител в отдельности. Долгое время это казалось невероятным. В ядрах клеток человека просто нет столько ДНК, чтобы кодировать миллионы различных антител в дополнение ко многим тысячам обычных белков, определяющих структуру, метаболизм и индивидуальность человеческого организма.

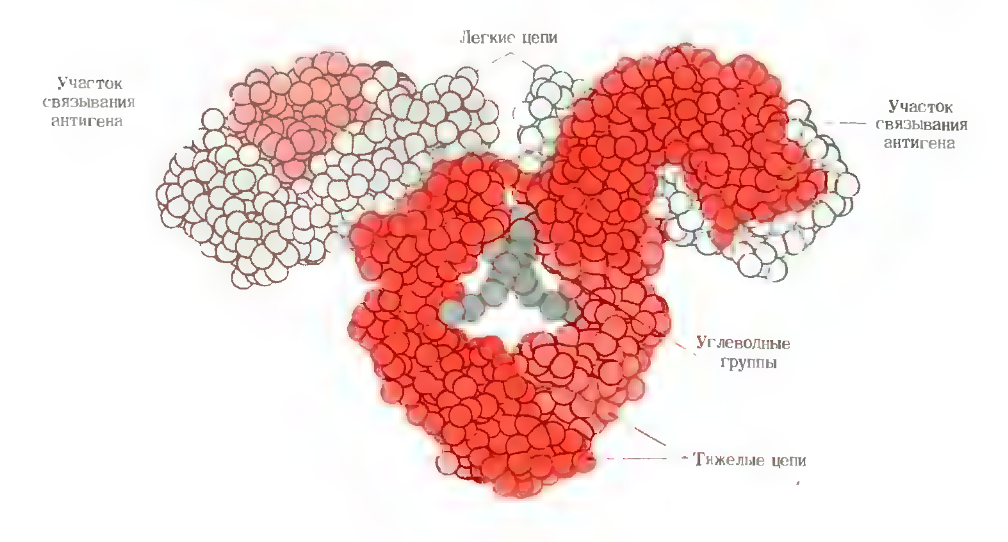
Ответ на эту загадку был получен в результате исследования структуры антител и генов, которые их кодируют. На рис. 30-16 показана структура антитела, мол. масса которого составляет приблизительно 160000. Молекула антитела состоит из двух тяжелых, т. е. длинных, полипептидных цепей (по 446 аминокислотных остатков в каждой) и из двух легких, т. е. коротких, цепей (по 214 аминокислотных остатков). Цепи соединены между собой поперечными дисульфидными мостиками; кроме того, в обеих цепях имеются еще и внутренние –S—S-связи. Каждая тяжелая и ка-

ждая легкая цепь содержит область с неизменной аминокислотной последовательностью, характерной для данного вида; она называется константной, или С-областью. В каждой цепи находится также вариабельная V-область, аминокислотная последовательность которой, по-видимому, различна у антител разных типов. Константная область тяжелых цепей состоит из трех доменов, имеющих сходные аминокислотные последовательности. Молекула антитела содержит два антигенсвязывающих участка, каждый из которых расположен в углублении («кармане») между концами вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Молекулярная модель антитела представлена на рис. 30-17.

Наличие в антителах константных и вариабельных областей уже давно навело ученых на мысль, что ДНК, направляющая синтез легких цепей, образуется в результате сплайсинга двух генов, один из которых кодирует вариабельную область, а другой константную. Доказательства, подтверждающие это предположение, были получены Сусуму Тонегавой и его сотрудниками, которые показали, что гены, кодирующие константную и вариабельную части легких цепей одного специфического типа, сильно сближены в ДНК иммуноцитов, вырабатывающих данный тип молекул, тогда как в ДНК другой линии иммуноцитов, не способной продуцировать этот тип легких цепей, они расположены далеко друг от друга. Тонегава и сотр. сделали вывод, что иммуноциты могут выбирать участки ДНК, кодирующие вариабельные части молекулы антитела, из разных и далеко отстоящих друг от друга областей генома клетки и перемещать их в место, расположенное следом за геном, кодирующим константную часть данного типа легких цепей. После соединения генов в одно целое РНК-полимераза может обеспечить синтез единой молекулы мРНК, кодирующей всю легкую цепь.

В результате дальнейших исследований выяснилось, что ДНК, кодирующая вариабельные области как легких, так и тяжелых цепей, состоит из генов нескольких типов, которые могут менять свое положение и собираться вместе с образованием разнообразных комбинаций (рис. 30-18). ДНК, определяющая вариабельные области антител, составлена приблизительно из четырехсот различных *вариабельных* (V) генов, двенадцати так называемых *генов разнообразия* (D-гены) и четырех *соединительных* (J) генов. Сочетание этих генов в различных комбинациях позволяет составить ДНК более чем для 20000 или даже большего числа вариабельных областей. Эти гены в свою очередь претерпевают дополнительные изменения в своих нуклеотид-

Рис. 30-17. Модель структуры иммуноглобулина, построенная на основании данных рентгеноструктурного анализа.



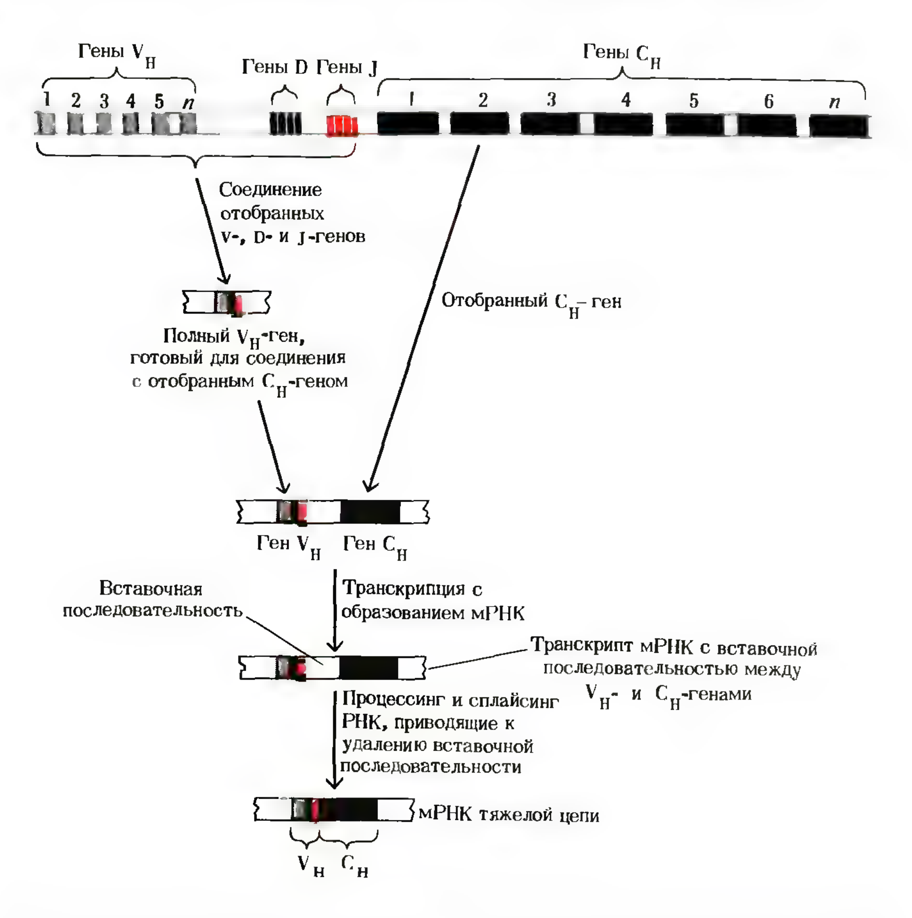


Рис. 30-18. Схема показывает, каким образом ген тяжелой цепи антитела может быть собран в результате перемещения генов V, D и J из разных участков генома; в конце концов образуется полный V_H-ген, соединенный с C_H-геном. Затем транскрипт мРНК подвергается процессингу, в ходе которого удаляются спейсерные участки и образуется зрелая мРНК, кодирующая тяжелую цепь.

ных последовательностях и присоединяются к различным участкам ДНК, кодирующим константные области, в результате чего образуются миллионы разных генов, ответственных за синтез антител. Многие вопросы синтеза антител ждут еще своего решения, однако уже сейчас ясно, что перемещение и рекомбинация генов или частей генов–это очень эффективный и точно воспроизводящийся процесс, при помощи которого иммуноциты способны вырабатывать антитела против практически любой макромолекулы.

30.12. Гены из разных организмов можно искусственным образом объединить

Мы рассмотрели несколько вариантов процесса генетической рекомбинации, реализующихся в природных условиях в клетках различных типов. Рекомбинацию генов или наборов генов можно провести также и в пробирке и при этом получить новые комбинации генов, не существующие в природе. Например, из двух разных видов организмов можно выделить гены, кодирующие два различных белка, соединить их вместе и получить новое сочетание генов. Такие искусственные рекомбинантные ДНК служат исключительно ценным инструментом в генетических исследованиях. Кроме того, как мы увидим позже, они могут использоваться и в практических целях.

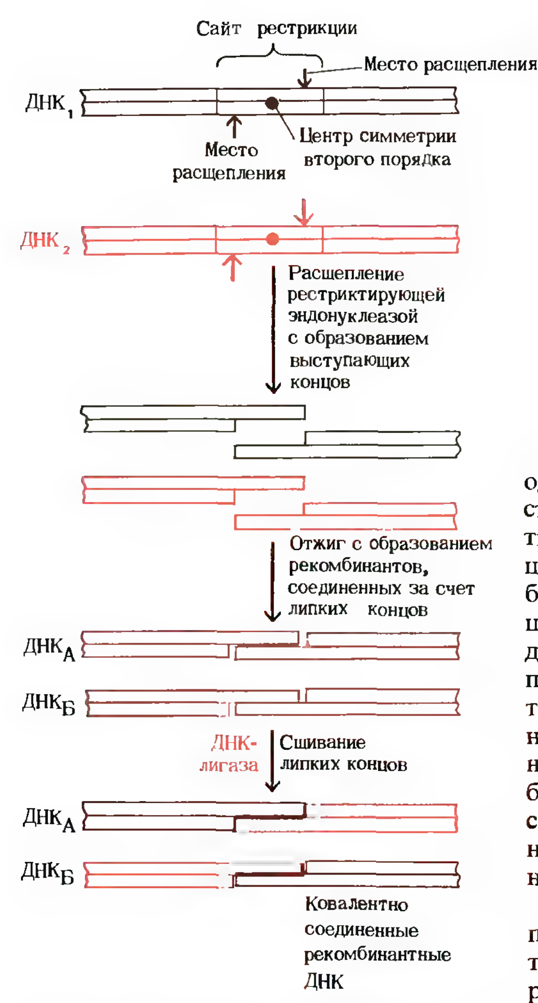


Рис. 30-19. Использование специфической рестриктирующей эндонуклеазы, которая образует в месте разрыва выступающие концы, для расщепления двух разных ДНК (ДНК$_1$ и ДНК$_2$) и получения фрагментов для последующей рекомбинации. Поскольку многие рестриктирующие эндонуклеазы расщепляют лишь специфические участки ДНК, обладающие осевой симметрией второго порядка, образующиеся липкие концы комплементарным образом взаимодействуют с концами любой другой ДНК, разрезанной той же самой эндонуклеазой. При отжиге из соответствующих фрагментов ДНК$_1$ и ДНК$_2$ могут снова образоваться исходные молекулы или же новые рекомбинантные ДНК, как это показано на рисунке. Ковалентное сшивание фрагментов осуществляется под действием ДНК-лигазы.

Развитие методов выделения генов и соединения их в новых сочетаниях стало главным биохимическим достижением, открывшим новую эру в генетических исследованиях.

Обнаружение рестриктирующих эндонуклеаз стало первым шагом на пути решения проблемы искусственной рекомбинации генов. Предположим, что мы хотим соединить вместе две двухцепочечные ДНК, выделенные из разных организмов (рис. 30-19). Каждую из них в отдельности обрабатывают одной и той же рестриктирующей эндонуклеазой, которая разрывает обе цепи ДНК с образованием в месте разрыва выступающих концов (разд. 27.24). Допустим, что в каждой из этих ДНК есть лишь один участок, узнаваемый данной рестриктазой. Следовательно, нуклеотидные последовательности выступающих концов двух расщепленных ДНК будут комплементарны. Если теперь смешать эти ДНК, нагреть и медленно охладить, то их липкие концы образуют комплементарные пары оснований, в результате чего возникнет новая рекомбинантная ДНК, цепи которой имеют единичные разрывы (рис. 30-19). При обработке таких ДНК ДНК-лигазой в присутствии источников энергии образуется новая ковалентно сшитая рекомбинантная ДНК.

Другой ключевой фермент, широко применяемый для соединения фрагментов ДНК,–это терминальная трансфераза, которая способна присоединять к 3′-концу цепей ДНК большое число следующих друг за другом дезоксирибонуклеотидных остатков. Этот фермент неспецифичен и может использовать в качестве предшественников dATP, dTTP, dGTP или dCTP. Поскольку для действия терминальной трансферазы не нужна матрица, она способна построить 3′-концевые последовательности, состоящие из нуклеотидов одного типа. Следовательно, к 3′-концам одной из двухцепочечной ДНК можно добавить poly(G)-хвосты, а к 3′-концам другой – poly(C)-хвосты. Поскольку такие хвосты комплементарны друг другу, с их помощью можно соединить две ДНК за счет образования комплементарных пар между основаниями их липких концов (рис. 30-20);

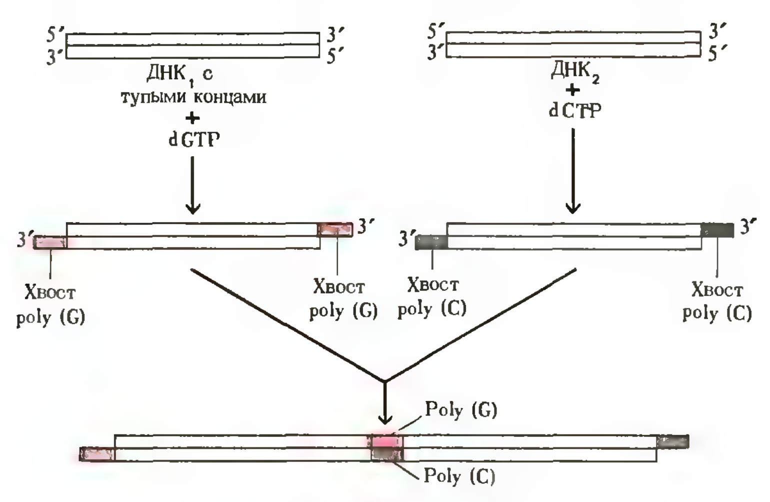


Рис. 30-20. Использование терминальной трансферазы для достраивания концов ДНК с целью обеспечения фрагментов ДНК комплементарными липкими концами.

ковалентная сшивка соединенных таким образом ДНК осуществляется ДНК-лигазой.

С помощью этих и других ферментов уже соединены многие ДНК из самых разных источников. Одним из первых достижений в этом направлении было встраивание гена рРНК, выделенного из шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, в плазмиду *E. coli*. В другом раннем эксперименте ДНК обезьяньего вируса SV40 (разд. 27.29) была встроена в ДНК фага λ, т. е. были объединены хромосомы животного и бактериального вирусов. С тех пор в лабораторных условиях были получены сотни различных искусственных рекомбинантных ДНК.

30.13. Плазмиды и фаг лямбда служат векторами для введения в бактерию чужеродных генов

Следующим этапом в развитии техники получения рекомбинантных ДНК была разработка способов введения чужеродных генов в клетку-хозяина. Наиболее распространенными носителями, используемыми для введения чужеродных генов в геном *E. coli*, получившими название векторов, стали плазмиды и ДНК фага λ. Плазмиды (разд. 27.15) – это небольшие кольцевые двухцепочечные ДНК, присутствующие в цитоплазме большинства видов бактерий. В каждой плазмиде содержится от 2000 до 100 000 оснований. Маленькие плазмиды могут присутствовать в клетке в количестве 20 и более копий; плазмид более крупного размера в клетке бывает не более 1–2 копий. Каждая плазмида содержит несколько, а иногда и много генов, которые реплицируются, транскрибируются и транслируются независимо от хромосомных генов, но одновременно с ними. Плазмиды легко выделить и отделить от бактериальных хромосом, от которых они отличаются по размеру, нуклеотидному составу и плотности. Плазмиды обладают двумя замечательными свойствами, полезными для генетического манипулирования. Во-первых, они могут переноситься от одной клетки к другой и даже от бактерии одного вида к бактерии другого. Например, если смешать клетки *Salmonella typhimurium* с клетками штамма *E. coli*, устойчивого к пенициллину, то первые приобретают устойчивость к пенициллину. Это связано с тем, что присутствующий в плазмиде *E. coli* ген устойчивости к пенициллину, назы-

ваемый R-фактором, может передаваться от клеток *E. coli* клеткам *S. typhimurium*. Второе свойство плазмид заключается в том, что в них можно достаточно легко встраивать чужеродные гены, которые затем в качестве «пассажиров» могут переноситься в *E. coli* и становиться там частью генома клетки-хозяина.

Для переноса чужеродного гена в *E. coli* можно использовать также ДНК фага λ. Если рекомбинантную ДНК фага λ, несущую чужеродный ген, смешать с белком оболочки фага λ, то образуются инфекционные фаговые частицы, при условии, конечно, что рекомбинантная ДНК по своему размеру не сильно отличается от природной ДНК фага. Этот способ введения чужеродного гена в *E. coli* лучше предыдущего, поскольку фаг λ чрезвычайно эффективно инфицирует клетку-хозяина, в то время как плазмиды проникают в интактную клетку *E. coli* лишь изредка. Фаг λ является умеренным фагом (разд. 30.9), и его ДНК вместе с чужеродным геном, который она несет, способна встраиваться в хромосому *E. coli*. В этом случае ДНК фага λ и чужеродный ген будут реплицироваться при каждом цикле клеточного деления.

Рассмотрим теперь более подробно, каким образом гены выделяют, вводят в клетки-хозяева, клонируют и осуществляют трансляцию с целью получения тех или иных продуктов. Слово «*клон*» имеет греческое происхождение и означает побег или черенок, применяемый для размножения растения. Оно используется в двух смыслах. Во-первых, под термином *клонирование клеток* понимают образование группы генетически идентичных клеток, развившихся из одной клетки, как это имеет место в случае линии иммуноцитов, настроенных на синтез определенного типа антител. Под термином же *молекулярное клонирование* или клонирование генов имеют в виду образование множества идентичных копий гена, полученных в результате репликации одного гена, введенного в клетку-хозяина.

30.14. Выделение генов и получение кДНК

Из фрагментов вирусных и бактериальных хромосом уже выделен целый ряд генов. Что же касается выделения специфических генов из фрагментированных эукариотических хромосом, то реализация этой процедуры все еще остается довольно сложной и трудоемкой задачей. Существует два основных подхода для получения специфических генов, подлежащих затем рекомбинации и клонированию. В одном из них, который получил название «шотган» (от англ. shotgun – дробовик), всю клеточную ДНК обрабатывают рестриктирующей эндонуклеазой, образующей в местах разрыва выступающие концы. Полученные фрагменты ДНК встраивают затем в плазмиды *E. coli*, «раскрытые» (т. е. переведенные в линейную форму) с помощью той же самой рестриктирующей эндонуклеазы. В результате образуется чрезвычайно сложная смесь, состоящая, вероятно, из тысяч разных рекомбинантных плазмид, среди которых лишь одна может содержать нужный ген. Для поиска плазмиды, несущей этот ген, разработаны специальные процедуры, которые называют скринингом. Одна из таких процедур описана в разд. 30.17.

Другой подход, используемый для получения нужных генов, состоит в конструировании на мРНК-матрице комплементарной по отношению к ней ДНК (кДНК). Хотя, как мы уже говорили, большинство клеток содержит трудноразделимые смеси множества различных мРНК, тем не менее иногда удается выделить чистую мРНК, кодирующую какой-либо один специфический белок. Для этого используют специализированные клетки, которые вырабатывают преимущественно какой-то один вид белка. Например, из ретикулоцитов – незрелых красных кровяных клеток –, в которых гемоглобин составляет 90% синтезируемого белка, можно выделить мРНК для α- и β-полипептидных цепей гемоглобина. Аналогичным образом из В-клеток островков Лангерганса поджелудочной

железы можно выделить мРНК для проинсулина человека (разд. 25.11).

Однако более общий подход к получению мРНК, кодирующей специфический белок, состоит в следующем. Клетки лизируют, собирают центрифугированием полисомы и обрабатывают их антителами против того белка, ген которого хотят извлечь. В популяции полисом должны присутствовать полисомы, синтезирующие данный белок на его матрице мРНК. В таких полисомах интересующий нас белок находится на разных стадиях своего синтеза (разд. 29.14). Очевидно, специфические антитела будут взаимодействовать только с полностью (или почти полностью) достроенным белком, который еще прикреплен к полисомам, синтезирующим его на матрице мРНК. Специфический комплекс антител с полисомами будет при этом выпадать в осадок и таким образом отделяться от прочих полисом. Специфическую мРНК, на которой синтезировался белок, можно затем извлечь из осадка и выделить с помощью хроматографических методов в практически чистом виде, т. е. без примесей других мРНК.

Теперь специфическую мРНК, кодирующую белок, ген которого надо получить, можно использовать в качестве матрицы для ферментативного синтеза кДНК с помощью обратной транскриптазы (разд. 28.26). Однако для функционирования обратной транскриптазы необходима затравочная ДНК. Напомним (разд. 28.22), что на 3'-конце молекул мРНК находится poly(A)-последовательность. Поэтому к мРНК добавляют poly(T), которая образует с poly(A)-хвостом мРНК двухцепочечные участки (рис. 30-21), служащие затравкой для обратной транскриптазы. В таких условиях обратная транскриптаза синтези-

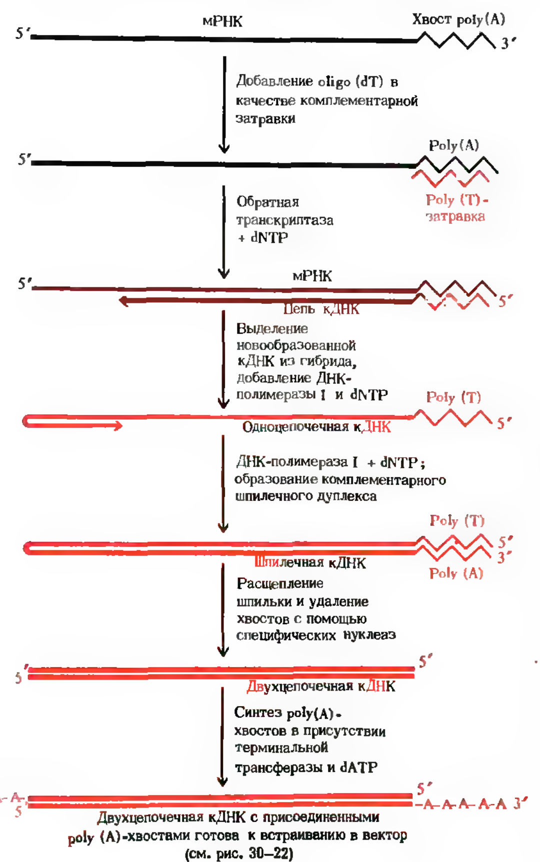


Рис. 30-21. Конструирование двухцепочечной кДНК на основе мРНК. Выделенную мРНК даниого гена транскрибируют с помощью обратной транскриптазы с образованием кДНК. Для работы обратной транскриптазы необходима затравочная ДНК, роль которой выполняет poly(T), комплементарная 3'-концевому poly(A)-хвосту мРНК. Полученную цепь кДНК, которую обычно метят с помощью радиоактивных предшественников dNTP, отделяют и используют одновременно в качестве матрицы и в качестве затравки для синтеза двухцепочечной шпилечной кДНК в присутствии ДНК-полимеразы I. Затем «шпильку» расщепляют, цепи подравнивают и к полученной двухцепочечной кДНК с тупыми концами присоединяют poly(A)-хвосты(рис. 30-20). Теперь такая кДНК, несущая poly(A), может быть встроена в вектор (рис. 30-22). Для обнаружения соответствующего природного гена во фрагментированных хромосомах применяют радиоактивную кДНК.

рует на матрице мРНК комплементарную цепь кДНК из смеси dATP, dTTP, dGTP и dCTP. Затем мРНК удаляют из гибрида мРНК–кДНК и на одноцепочечной кДНК с помощью ДНК-полимеразы I достраивают вторую цепь; в результате образуется двухцепочечная кДНК, содержащая «шпильку». После расщепления «шпильки» (рис. 30-21) остается синтетическая двухцепочечная кДНК, соответствующая белку, кодируемому интересующим нас геном. Чтобы упростить последующие процедуры, кДНК в ходе реакции с обратной транскриптазой обычно синтезируют из ^{32}P-дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфатов.

В результате мы имеем синтетическую кДНК, которая кодирует аминокислотную последовательность данного белка. Заметим, однако, что если эту синтетическую кДНК получали с эукариотической мРНК, то она не идентична природному гену этого белка, поскольку не содержит ни интронов, т.е. вставочных последовательностей, ни стартовых и терминирующих сигналов, присущих генам большинства эукариотических белков.

30.15. Конструирование вектора, несущего ген

Полученную описанным выше способом кДНК можно теперь встроить в плазмиду или вирусный вектор. Для включения кДНК в плазмиду ее необходимо снабдить соответствующими хвостами или липкими концами (рис. 30-21). Это лучше всего сделать путем присоединения к противоположным 3′-концам двух цепей кДНК ряда повторяющихся дезоксирибонуклеотидных остатков одного типа, например остатков А. Их присоединяют с помощью терминальной трансферазы, которая в присутствии dATP достраивает на обоих концах двухцепочечной кДНК poly(A)-хвост, состоящий из 50–100 остатков. После этого кДНК готова к включению в плазмидный вектор (рис. 30-21).

Сначала плазмиду переводят в линейную форму, расщепляя ее в одной точке рестриктирующей эндонуклеазой с образованием в месте расщепления тупых концов (разд. 27.24). Затем 3′-концы линейной плазмиды снабжают хвостами, комплементарными тем, которыми были достроены молекулы кДНК. Если кДНК были достроены poly(A)-хвостами, то плазмиду следует достроить 3′-хвостами из poly(T). После этого линейную плазмиду, обладающую хвостами, и кДНК просто смешивают и предоставляют им возможность образовать пары между комплементарными основаниями. Среди продуктов такой гибридизации будет находиться увеличенная кольцевая плазмида, содержащая новый ген, который связан с плазмидой только за счет комплементарного взаимодействия липких концов. Эти концы можно теперь ковалентно соединить с помощью ДНК-лигазы (разд. 28.12), в результате чего образуется ковалентно замкнутая кольцевая плазмида, несущая новый ген (рис. 30-22).

30.16. Встраивание «нагруженных» плазмид в хромосому *E. coli*

Теперь рекомбинантные плазмиды смешивают с клетками *E. coli* для трансформации. Попасть в клетку и встроиться в хромосому *E. coli* удается лишь нескольким плазмидам, однако эффективность проникновения плазмид можно повысить, добавляя ионы Ca^{2+}. Простейший путь для выявления клеток *E. coli*, в которые попали новые гены, состоит в следующем. Клетки выращивают на твердой питательной среде, извлекают из каждой клеточной колонии ДНК и затем определяют, какая из колоний содержит ДНК, гибридизующуюся с радиоактивной кДНК, синтезированной на выделенной ранее мРНК. После этого выращивают колонию клеток *E. coli*, содержащих рекомбинантную плазмиду, в ферментерах в больших объемах на свежей питательной среде, увеличивая число рекомбинантных плазмид в 10^{12} и более раз.

Подобная рекомбинантная ДНК, несущая неродственные гены из двух разных видов организмов, называется *химерной ДНК*. В «Илиаде» Гомера Химерой называлось мифическое существо с головой льва, телом козы и хвостом змеи.

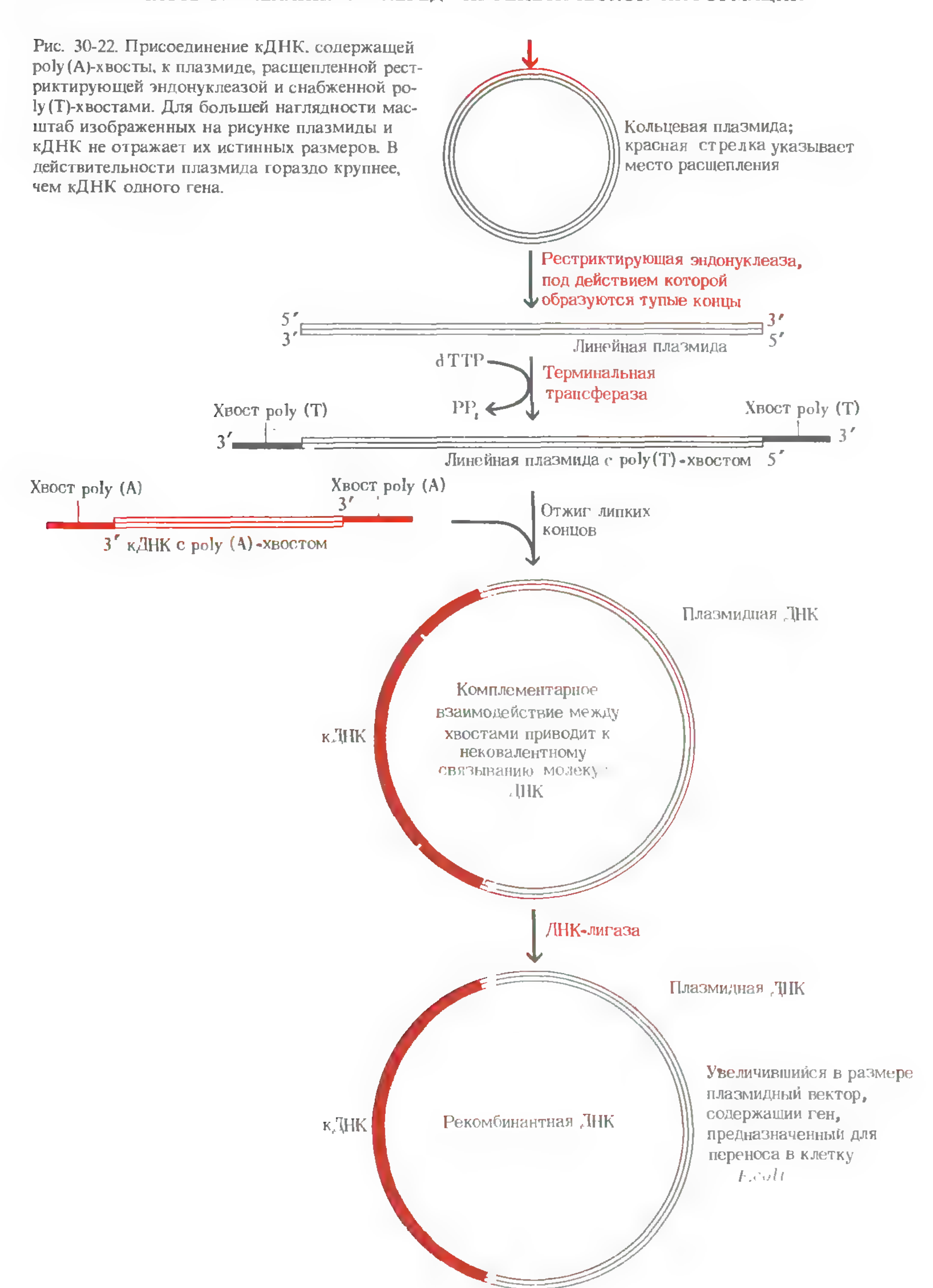


Рис. 30-22. Присоединение кДНК, содержащей poly(A)-хвосты, к плазмиде, расщепленной рестриктирующей эндонуклеазой и снабженной poly(T)-хвостами. Для большей наглядности масштаб изображенных на рисунке плазмиды и кДНК не отражает их истинных размеров. В действительности плазмида гораздо крупнее, чем кДНК одного гена.

30.17. Клонирование кДНК можно использовать для поиска соответствующих природных генов

Клонированная описанным выше способом кДНК не идентична природному гену данного белка, поскольку она не содержит интронов, которые обычно присутствуют во многих (если не в большинстве) эукариотических генах, кодирующих белки (разд. 27.28). Вспомним, что после коллинеарного матричного синтеза мРНК на таких генах в ходе обычной биологической транскрипции участки мРНК, комплементарные интронам в ДНК, вырезаются до трансляции мРНК на рибосомах (разд. 28.23). Клонированную кДНК можно использовать для того, чтобы из генома родительской клетки, содержащей тысячи генов, «вытащить» настоящий природный ген, кодирующий данный белок. С этой целью выделяют ДНК исследуемого организма, расщепляют ее какой-либо рестриктирующей эндонуклеазой и встраивают образовавшиеся многочисленные фрагменты ДНК с помощью описанных выше методов в подходящий вектор – обычно в ДНК фага λ. Затем рекомбинантные ДНК упаковывают в вирусные частицы, добавляя белок оболочки, и полученными фаговыми частицами, несущими встроенный ген, заражают нормальные клетки *E. coli*. Из лизатов этих клеток можно получить много различных вирусных ДНК, которые содержат все (или почти все) гены донорного организма. Из этой «библиотеки генов» природный ген, кодирующий интересующий нас белок, можно выделить простым и специфическим способом: к «библиотеке» добавляют ^{32}P-кДНК, соответствующую этому белку, смесь нагревают и затем дают ей остыть. При этом между цепями кДНК и природного гена формируются гибридные дуплексы. Хотя в природном гене содержится определенное число интронов, не имеющих комплементарных партнеров в кДНК, его экзоны узнают цепи кДНК и гибридизуются с ними. Образующиеся радиоактивные гибриды можно выделить, извлечь из них интересующий нас природный ген и клонировать его в плазмиде или в фаге λ по описанной выше схеме.

Поскольку в настоящее время нуклеотидную последовательность в ДНК можно определить быстро и точно (разд. 27.29), по установленной последовательности кДНК выводят аминокислотную последовательность кодируемого ею белка, а также нуклеотидную последовательность мРНК, соответствующей этому белку. И хотя кДНК не содержит информации о полной нуклеотидной последовательности природного гена, соответствующего эукариотическому белку, тем не менее при помощи меченой кДНК, полученной с мРНК данного белка, природный ген можно выделять и клонировать.

30.18. Экспрессия клонированных генов усиливается с помощью промотора

Для транскрипции многих генов и последующей трансляции их мРНК с образованием соответствующих белков необходимо участие промотора и оператора, которые указывают место, в котором РНК-полимераза связывается и начинает транскрипцию (разд. 29.27); в противном случае нельзя ожидать, что встроенный в реципиентную клетку чужеродный ген обязательно будет транскрибироваться и транслироваться. Чтобы обеспечить транскрипцию встроенного гена, часто приходится помещать этот ген в участок ДНК плазмиды или фага λ, расположенный следом за промотор-операторной областью. Например, ген можно встроить в участок ДНК *E. coli*, содержащий *lac*-оперон, так, чтобы этот ген следовал за промотор-операторной областью этого оперона (разд. 29-27). Если поместить клетки *E. coli*, несущие такую рекомбинантную ДНК, в среду с лактозой, но без глюкозы, то встроенный ген будет транскрибироваться и транслироваться вместе с участком ДНК *lac*-оперона, расположенным между оператором и встроенным геном.

Этот подход был использован при клонировании гена *соматостатина* – пептидного гормона (14 аминокислотных остатков) из гипоталамуса, регулирующего секрецию инсулина, глюкагона и гормона роста. Ген соматостатина был в этом случае синтезирован химически и присоединен к концу гена β-галактозидазы. Два связанных между собой гена были встроены в плазмиду *E. coli*, и полученная рекомбинантная плазмида была введена в клетки *E. coli*. В результате такие клетки синтезировали большие количества гибридного белка, состоящего из ковалентно соединенных друг с другом β-галактозидазы и соматостатина. Такая молекула, представляющая собой гибрид собственного белка *E. coli* и белка позвоночного организма, называется *химерным белком*. Гибрид β-галактозидазы и соматостатина расщепляли по пептидной связи, соединяющей два белка, что приводило к освобождению обладающего биологической активностью соматостатина.

30.19. Многие гены уже клонированы в различных клетках-хозяевах

С помощью методов, подобных описанным выше, в клетках *E. coli* было проклонировано большое число разных генов. Во многих случаях новые гены экспрессировались в форме специфических белков или соответствующих мРНК. В одном из вариантов клонирования в нормальные клетки *E. coli* были введены добавочные копии одного из генов *E. coli*. В результате такие клетки синтезировали большое число дополнительных копий продукта этого гена. В другом варианте в клетках *E. coli* были успешно проклонированы гены, выделенные из различных эукариотических организмов. Среди них можно назвать гены инсулина, гипофизарного гормона роста (соматотропина), α- и β-глобинов, рРНК, соматостатина и овальбумина. Была осуществлена и обратная рекомбинация: бактериальные гены были введены в геном ряда эукариотических клеток. Например, ген β-галактозидазы из *E. coli* (разд. 29-23) был внедрен в растущие в культуре клетки мыши. Особенно интересный случай представляет введение гена *E. coli*, кодирующего фермент *гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу* (разд. 22.19), в культуру клеток соединительной ткани, взятой у людей с синдромом Леша–Найхана (разд. 22.19), при котором этот фермент генетически поврежден. Встроенный ген *E. coli* экспрессировался с образованием бактериального фермента. Таким образом, генетический дефект клеток человека удалось исправить в лабораторных условиях с помощью введения соответствующего бактериального гена.

Эукариотические гены одних видов были также клонированы и экспрессировались в клетках других видов. Например, ген, кодирующий α-цепь гемоглобина кролика, был введен в растущие в культуре мышиные клетки и экспрессировался в них. Внедрение чужеродного гена в эукариотические клетки не всегда, однако, сопровождается его транскрипцией и трансляцией с образованием активного белка. Регуляция экспрессии генов у эукариот пока еще мало изучена (разд. 29.22); во время написания этой книги проводится большое число исследований по выяснению условий экспрессии рекомбинантных генов в эукариотических клетках.

30.20. Рекомбинантные ДНК и клонирование генов открыли новые направления генетических исследований

В популярной литературе уделяется много внимания возможному практическому использованию рекомбинантных ДНК, однако не меньшее, а может быть, и большее значение имеет то, что клонирование генов открыло новые возможности решения многих фундаментальных проблем молекулярной генетики, казалось бы не разрешимых с помощью старых методов. Теперь появилась возможность выделять и получать в большом количестве фактически любой ген для того, чтобы изучать его нуклеотидную последовательность, а также после-

довательность мРНК и белка, кодируемых этим геном. Стало доступным более прямое картирование генов в хромосомах. Особенно важное значение имеет выделение, клонирование и анализ разнообразных сигнальных и регуляторных участков ДНК, таких, как *i*-гены, промоторы и операторы. Открылись также возможности изучения нуклеотидных последовательностей и функции интронов в структурных генах эукариот. В настоящее время с помощью методов клонирования исследуется механизм амплификации генов, т. е. синтеза большого числа копий какого-то одного гена, происходящего в раннем эмбриогенезе. Эти же методы применяются при анализе различных генов позвоночных, которые соединяются с образованием ДНК, кодирующей легкие и тяжелые цепи антител. Более доступной стала также идентификация регуляторных механизмов, осуществляющих репрессию и дерепрессию специфических генов в эукариотических хромосомах. В решении всех этих задач использование рекомбинантных ДНК и методы клонирования играли и будут играть ведущую роль.

30.21. Исследование рекомбинантных ДНК имеет важное практическое значение

Клонирование рекомбинантных генов и их экспрессия с образованием белковых продуктов клетками *E. coli* и дрожжей, которые можно вырастить в огромных количествах, позволяют осуществить промышленное производство многих полезных белков, которые другими способами получить в больших масштабах очень трудно. Перспективы использования рекомбинантных ДНК привели к возникновению новой ветви молекулярной биологии – *генетической инженерии*.

Простым примером может служить бактериальный фермент ДНК-лигаза, который оказался столь полезным в исследованиях по биохимии генов. Этот фермент вырабатывается в большом количестве клетками *E. coli*, в которые введено много дополнительных копий гена ДНК-лигазы. Продукция ДНК-лигазы такими клетками в несколько сот раз превышает продукцию нормальных клеток. Клонированием в *E. coli* и в дрожжах дополнительных копий генов можно получить очень большие количества многих других ферментов, используемых в промышленности. Еще один пример достижений генетической инженерии – это введение в обычную безвредную бактерию генов, способных окислять углеводороды нефти; такая бактерия может быть использована при очистке нефтяных разливов.

Были клонированы гены ряда белков, необходимых в медицине. Нужный для лечения диабета инсулин в настоящее время получают из поджелудочной железы забитых на бойне животных. Хотя такой инсулин удовлетворяет сегодняшние потребности в этом препарате, тем не менее в связи с увеличением случаев заболевания сахарным диабетом, которому в США подвержено более 5% населения, в какой-то момент спрос может превысить предложение. Кроме того, инсулин забиваемых на бойнях животных не идентичен по своей аминокислотной последовательности инсулину человека, и потому для некоторых людей он неэффективен и даже непереносим. Недавно удалось заставить *E. coli* синтезировать инсулин человека, введя в нее соответствующий ген. Полученный таким способом синтетический инсулин человека уже применяется при лечении диабета. Сходным образом благодаря рекомбинантным ДНК стало возможным использование в лечебной практике гипофизарного гормона роста (соматотропина), ранее недоступного для медицинских целей. Это важно потому, что гормон роста животных из-за различий в аминокислотной последовательности соматотропина человека и животных неэффективен при лечении карликовости человека.

В клетках, несущих соответствующие клонированные гены, можно также с высоким выходом получать большое количество разнообразных белков, полезных в сельском хозяйстве. Например, с помощью методов генетической инженерии была создана новая высокоэффективная

вакцина против ящура крупного рогатого скота, овец и свиней. Это вирусное заболевание неизлечимо, а заболевшие животные оказываются непригодными к пище. В странах третьего мира ящур представляет собой эндемическую болезнь, приносящую огромный экономический урон и приводящую к человеческим жертвам. Для получения вакцины против этого заболевания был использован клонированный белковый антиген вируса ящура. Другая очень важная задача заключается во введении генов, кодирующих ферменты и другие белки азотфиксации, в геном культурных растений, обычно не способных фиксировать азот. В этом направлении до практических результатов пока еще далеко, но совершенно очевидно, что достижение этой цели окажет глубокое воздействие на сельское хозяйство во всем мире.

30.22. Осуществлено клонирование генов интерферонов

Интерфероны – это белки, секретируемые некоторыми клетками позвоночных при заражении их вирусом. Они связываются с клеточной мембраной незараженных клеток и придают им иммунность по отношению к инфекции этим же или каким-либо другим вирусом. Вывод о существовании таких веществ первоначально был сделан на основании медицинских наблюдений, согласно которым больные одним вирусным заболеванием не подвержены в это время другой вирусной инфекции; это навело на мысль, что первая вирусная инфекция препятствует развитию второй. Когда в 50-х годах был открыт интерферон, появилась надежда, что он окажется полезным при лечении вирусных заболеваний, большая часть которых не поддается лечению с помощью лекарств и антибиотиков. К таким болезням относятся обычная простуда, грипп, полиомиелит, ветряная оспа, герпес, вирусный гепатит и многие другие. В первую очередь рассчитывали на то, что интерферон сможет помочь в лечении некоторых видов рака у человека, которые, как долгое время предполагалось, вызываются вирусами. Однако на протяжении многих лет интерферон оставался загадкой, поскольку оказалось, что он синтезируется в зараженных клетках в крайне незначительных количествах и возможность его выделения в количествах, достаточных для определения структуры и изучения биологической активности в течение длительного времени, представлялась маловероятной.

С развитием эффективных методов выделения и идентификации следовых количеств белков и их генов было установлено, что интерфероны – это гликопротеины, состоящие приблизительно из 160 аминокислотных остатков. Каждый вид позвоночных может продуцировать в ходе вирусной инфекции по меньшей мере три разных типа интерферонов: один синтезируется фибробластами соединительных тканей, другой – лейкоцитами, третий – Т-лимфоцитами (разд. 6.11). Связываясь с мембраной здоровых клеток, интерфероны стимулируют образование специфических ферментов, которые способны разрушать вирусные мРНК и инактивировать фактор инициации белкового синтеза в рибосомах, препятствуя тем самым экспрессии вирусных генов в клетке-хозяине.

В 1980 г. исследовательские группы в Швейцарии и США выделили ген лейкоцитарного интерферона человека и ввели его в плазмиду *E. coli*. В настоящее время предпринимаются усилия по промышленному получению интерферонов человека с помощью интерфероновых генов, клонированных в клетках *E. coli*. Пока еще неясно, будут ли интерфероны эффективны при лечении рака, однако очевидно, что исследования в данной области откроют новую эру в понимании природы вирусных заболеваний человека.

Краткое содержание главы

Как в прокариотических, так и в эукариотических клетках содержатся ферментные системы, способные исправлять ошибки репликации и различные формы повреждения ДНК, вызываемые гидро-

лизом или действием внешних мутагенов – ультрафиолетового излучения, ионизирующей радиации, а также дезаминирующих и алкилирующих агентов. Неисправленные с помощью механизма реперации повреждения ДНК приводят к наследуемым мутациям, которые могут быть летальными, неполностью подавляющими функцию, «молчащими» или даже благоприятными в зависимости от места и природы повреждения. Один из типов мутаций обусловлен встраиванием в ДНК неправильного основания, что приводит к изменению одного кодона и в большинстве случаев к замене одной аминокислоты в белковом продукте. Другой важный тип мутаций – это так называемые мутации со сдвигом рамки, которые представляют собой потерю или приобретение одного или нескольких нуклеотидов. Такие мутации вызывают сдвиг рамки считывания кодонов, в результате чего образуется белковый продукт, аминокислотная последовательность которого искажена, начиная с того места, где произошло выпадение или добавление нуклеотида. Мутации обычно возникают беспорядочно, однако вероятность их появления сильно возрастает под действием мутагенов, к которым относятся дезаминирующие и алкилирующие агенты, а также другие вещества, способные изменять структуру оснований. Почти все канцерогенные соединения являются мутагенами, что может быть проверено с помощью простых тестов, основанных на выращивании бактерий.

В нормальных природных условиях гены и наборы генов претерпевают рекомбинацию в ходе таких биологических процессов, как трансформация бактерий, вирусная трансдукция, конъюгация бактерий и обмен генов при слиянии половых эукариотических клеток. Гены и группы генов могут также перемещаться с одного места на другое как в пределах одной и той же хромосомы, так и между разными хромосомами. Например, белки-антитела, которые вырабатываются клетками крови (иммуноцитами) позвоночных против миллионов самых разных, не содержащихся в организме макромолекул (антигенов), кодируются последовательностями ДНК, возникающими в результате перемещения и перегруппировки сравнительно небольшого числа разных типов генов. При транскрипции с таких последовательностей могут синтезироваться самые разные мРНК для миллионов разных антител, каждый из которых способен специфически взаимодействовать с одним и только одним типом молекул антигена.

Новые комбинации генов можно создать и искусственным путем в лабораторных условиях с помощью таких ферментов, как рестриктирующие эндонуклеазы, ДНК-лигаза и терминальная трансфераза. Чтобы встроить чужеродный ген в геном клеток *E. coli*, этот ген сначала пришивают к вектору, которым служит либо плазмида *E. coli*, либо ДНК фага λ. Полученная рекомбинантная ДНК может затем попасть в клетку *E. coli*, ковалентно включиться в ее хромосому и в составе этой хромосомы реплицироваться. Если новый ген, содержащийся в рекомбинантной ДНК, обладает подходящими сигнальными последовательностями, указывающими начало и конец транскрипции, то такой ген будет транскрибироваться и транслироваться с образованием соответствующего белкового продукта. Многие гены из животных клеток уже были введены в бактерии, а бактериальные гены в свою очередь были встроены в эукариотические клетки. С помощью бактерий, в геномы которых введены соответствующие гены, можно получать применяемые в медицине белковые препараты – инсулин, гормон роста и интерфероны.

ЛИТЕРАТУРА

Репарация, мутации и канцерогены

Ames B. N. Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer, Science, 204, 587–593 (1979).

Cairns J. The Cancer Problem, Sci. Am., 233, 64–78, November 1975. Вдумчивый анализ проблемы, сделанный молекулярным биологом.

Devoret R. Bacterial Tests for Potential Carcinogens, Sci. Am., 241, 40–49, August 1979.

Drake J.M. The Molecular Basis of Mutation, Holden-Day, San Francisco, 1970.

Hanawalt P. et al. DNA Repair in Bacteria and Mammalian Cells, Annu. Rev. Biochem., **48**, 783–836 (1979). Подробный обзор современного состояния проблемы.

Рекомбинация в природе

Ayala F.J., Kiger J.A., Jr. Modern Genetics, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1980. Дано описание бактериальной трансформации, вирусной трансдукции и бактериальной конъюгации.

Campbell A.M. How Viruses Insert Their DNA into the DNA of the Host Cell, Sci. Am., **235**, 102–113, December 1976.

Cohen S.N., Shapiro J.A. Transposable Genetic Elements, Sci. Am., **242**, 40–49, February 1980.

Антитела

Hood L.E., Weissman I.L., Wood W.B. Immunology, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1978.

Milstein C. Monoclonal Antibodies, Sci. Am., **243**, 66–74, October 1980. Описана техника получения антител одного вида в больших количествах в культуре животных клеток.

Клонирование ДНК и генетическая инженерия

Abelson J., Butz E. (eds). Recombinant DNA, Science, vol. 209 (1980). Этот том целиком состоит из важных научно-исследовательских статей и содержит ценный словарь терминов.

Anderson W.B., Diacumakos E.G. Genetic Engineering in Mammalian Cells, Sci. Am., **245**, 106–121, July 1981.

Derobertis E.M., Gurdon J.B. Gene Transplantation and the Analysis of Development, Sci. Am., **241**, 74–82, December 1979.

Grobstein, Clifford. The Recombinant-DNA Debate, Sci. Am., **237**, 22–33, July 1977.

Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, Freeman, San Francisco, 1981. Сборник статей, появившихся в сентябрьском номере журнала Scientific American, который посвящен генетической инженерии и использованию микроорганизмов в промышленности; особое внимание уделено генетическим изменениям и клонированию.

Setlow J.K., Hollaender A. (eds.). Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum, New York, 1979. Сборник статей, написанных специалистами.

Watson J.D., Tooze J. The DNA Story: A Documentary History of Gene Cloning, Freeman, San Francisco, 1981.

Интерфероны

Derynck R., Content J., Declercq E., Volckaert G., Tavernier J., Devos R., Fiers W. Isolation and Structure of a Human Fibroblast Interferon Gene, Nature, **285**, 542–547 (1980).

Вопросы и задачи

1. *Механизмы репарации ДНК*
   а) Как вы полагаете, почему УФ-эндонуклеаза расщепляет ДНК с 5'-стороны, а не с 3'-стороны от тиминового димера?
   б) Почему маловероятно обнаружение таких ферментов, которые исправляли бы поврежденную мРНК столь же эффективно, как репарируется поврежденная ДНК?
   в) На основании того, что вы знаете о механизмах репарации ДНК, предположите, каковы будут последствия повреждений гена рентгеновскими лучами, которые часто приводят к разрывам в обеих цепях ДНК?
2. *Последствия замены одного основания.* Перечислите возможные последствия мутации, вызванной заменой одного основания эукариотической ДНК в участке, кодирующем фермент.
3. *Рекомбинация фрагментов, полученных с помощью рестриктирующей эндонуклеазы.* Предположим, у вас есть две двухцепочечные молекулы ДНК – А и Б. Цепь 1 $ДНК_А$ имеет последовательность

   (5')ATATGAATTCAATT(3')

   а цепь 1 $ДНК_Б$ имеет последовательность

   (5')CGCGGAATTCCCGG(3')

   Обе ДНК расщепляют рестриктирующей эндонуклеазой *Eco* RI, полученные фрагменты смешивают, чтобы они смогли в смеси перекомбинироваться, и затем ковалентно сшивают с помощью ДНК-лигазы. Напишите последовательности всех ДНК, образующихся после рекомбинации. Укажите, какие из них окажутся новыми рекомбинантами.
4. *Кодон UAA в качестве сигнала.* Нуклеотидные остатки в прокариотической мРНК нумеруются таким образом, что остатки кодона AUG для инициирующего метионина белкового продукта (состоящего из 140 аминокислот) имеют номера 1, 2 и 3. Какое влияние на белковый продукт оказывает

наличие в положениях 330–332, 334–336 и 338 340 триплета (5')UAA? Каким был бы ваш ответ в случае эукариотической мРНК?

5. *Построение рестрикционной карты вируса.* ДНК, выделенная из вируса, инфицирующего животные клетки, имеет обычное эквивалентное соотношение оснований и устойчива ко всем известным экзонуклеазам.
   а) Что говорят вам эти факты о третичной структуре этой ДНК?
   б) При расщеплении рестриктирующей эндонуклеазой *Eco* RI образуется один тип двухцепочечной ДНК с мол. массой $3{,}4 \cdot 10^6$. Что говорит о структуре ДНК такой результат?
   в) При расщеплении исходной вирусной ДНК с помощью рестриктирующей эндонуклеазы *Hpa* I из *Haemophilus parainfluenzae* образуются три фрагмента с мол. массами $1{,}4 \cdot 10^6$, $0{,}7 \cdot 10^6$ и $1{,}3 \cdot 10^6$, которые можно разделить гель-электрофорезом. При совместном действии *Eco* RI и *Hpa* I из исходной вирусной ДНК образуются четыре фрагмента. Самый большой из них имеет мол. массу $1{,}3 \cdot 10^6$, а самый маленький – $0{,}6 \cdot 10^6$. Фрагменты обозначают буквами в соответствии с их размером (А – самый большой). Какова молекулярная масса двух других фрагментов, образовавшихся при совместном действии *Eco* RI и *Hpa* I?
   г) После частичного (т. е. неполного) расщепления вирусной ДНК обоими ферментами из электрофоретической полосы, соответствующей фрагменту с мол. массой $1{,}3 \cdot 10^6$, выделили ДНК и подвергли ее полному расщеплению с помощью *Hpa* I. В результате получили три полосы, одна из которых обладала электрофоретической подвижностью, соответствующей мол. массе $1{,}3 \cdot 10^6$, а две другие полосы соответствовали двум меньшим фрагментам. Составьте возможную рестрикционную карту фрагментов А, Б, В и Г вирусной ДНК и укажите точки расщепления.
   д) При полном расщеплении ДНК мутантного штамма этого же животного вируса рестриктирующими эндонуклеазами *Eco* RI и *Hpa* I образуются только три фрагмента с мол. массами $2{,}1 \cdot 10^6$, $0{,}6 \cdot 10^6$ и $0{,}7 \cdot 10^6$. Каково простейшее объяснение мутации, приведшей к изменению картины расщепления?

6. *Функциональные домены в белках.* Есть основания считать, что белки эукариот состоят из функциональных доменов, т. е. из независимых областей, каждая из которых определяет какое-либо свойство белка или его функцию. Было высказано предположение, что существование таких доменов выгодно с эволюционной точки зрения, поскольку участки ДНК, кодирующие каждый домен, могут обмениваться и рекомбинировать с образованием новых генов, кодирующих белки с новой комбинацией свойств и функций. Какие особенности эукариотической транскрипции могли бы привести к возникновению таких новых генов и почему?

7. *Клонирование интерферона человека.* Используя рекомбинантные ДНК, можно значительно увеличить наработку белков, присутствующих в клетке в малом количестве. Интерфероны антивирусные, а возможно, и противораковые агенты – можно выделить из лейкоцитов человека, однако выход интерферона составляет всего 1 мкг из 1 л крови, поэтому при таком выделении он стоит очень дорого. Гены интерферонов можно клонировать и получить их экспрессию в бактериях, которые легко выращивать в количестве сотен и тысяч литров.
   а) Подсчитайте, сколько интерферона можно получить в результате клонирования гена интерферона в бактериях, предполагая, что в 1 мл культуры, достигшей стационарной фазы, содержится 10^9 бактериальных клеток, а в каждой клетке присутствует 10^{-1} пг белка, 5% которого составляет интерферон.
   б) Если мол. масса интерферона составляет 30000, то сколько молекул интерферона вырабатывает одна клетка? (Подсказка: число Авогадро, т. е. число молекул в одном моле вещества, равно $6{,}02 \cdot 10^{23}$.)
   в) Какое количество клонированного интерферона человека можно теоретически получить из 100 л культуры, если учесть данные, приведенные в п. б)?

8. *Рекомбинация кольцевых ДНК.* Предположим, у вас есть две кольцевые двухцепочечные ДНК – одна большая, другая маленькая, которые надо объединить в один кольцевой дуплекс. У вас есть рестриктирующая эндонуклеаза, которая может расщепить каждую ДНК лишь в одной точке с образованием в месте разрыва выступающих концов.
   а) Каким образом вы осуществите соединение большой и малой ДНК в одно кольцо большего размера?
   б) Укажите структуру основных побочных продуктов рекомбинации.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ОБОЗНАЧЕНИЯ ЕДИНИЦ, ПРИСТАВКИ, КОНСТАНТЫ И КОЭФФИЦИЕНТЫ ПЕРЕСЧЕТА

А	Ампер
Å	Ангстрем
атм	Атмосфера
Кл	Кулон
кал	Калория
Ки	Кюри
см	Сантиметр
имп/мин	Число импульсов в минуту
дм	Дециметр
расп./мин	Число распадов в минуту
г	Грамм
ч	Час
Дж	Джоуль
ккал	Килокалория
кДж	Килоджоуль
K	Кельвин
K	Константа равновесия
л	Литр
ln	Натуральный логарифм (по основанию *e*)
lg	Десятичный логарифм (по основанию 10)
мкм	Микрометр
мкмоль	Микромоль
M	Молярная концентрация
m	Моляльная концентрация
м	Метр
мг	Миллиграмм
мин	Минута
мл	Миллилитр
мм	Миллиметр
мм рт. ст.	Миллиметры ртутного столба
мВ	Милливольт
н.	Нормальная концентрация
нм	Нанометр
pH	$-\lg[H^+]$
p*K*	$-\lg K'$
об	Оборот
с	Секунда
S	Сведберг
В	Вольт

Некоторые приставки, используемые в Международной системе единиц

Порядок	Приставка	Обозначение
10^6	мега	М
10^3	кило	к
10^{-1}	деци	д
10^{-2}	санти	с
10^{-3}	милли	м
10^{-6}	микро	мк
10^{-9}	нано	н
10^{-12}	пико	п

Некоторые физические константы

Число Авогадро (*N*)	$6{,}02 \cdot 10^{23}$ молекул
Кюри (Ки)	$3{,}70 \cdot 10^{10}$ расп./с
Единица атомной массы (Дальтон)	$1{,}661 \cdot 10^{-24}$ г
Число Фарадея (*F*)	23 062 кал/(В · моль) 96 485 Кл/моль
Универсальная газовая постоянная (*R*)	1,987 кал/(моль · К) 8,314 Дж/(моль · К)
Постоянная Планка (*h*)	$1{,}584 \cdot 10^{-34}$ кал · с $6{,}626 \cdot 10^{-34}$ Дж · с

Математические константы

$\pi = 3{,}1416$

$e = 2{,}718$

$\ln(\log_e)x = 2{,}303 \lg x$

Некоторые коэффициенты пересчета

Длина	1 см = 10 мм = 10^4 мкм = = 10^7 нм = 10^8 Å = 0,394 дюйма; 1 дюйм = 2,54 см
Масса	1 г = 10^{-3} кг = 10^3 мг = 10^6 мкг = $3{,}53 \cdot 10^{-2}$ унции; 1 унция = 28,3 г
Температура	°C = 5/9 (°F − 32); K = °C + + 273
Энергия	1 Дж = 10^7 эрг = 0,239 кал; 1 кал = 4,184 Дж
Давление	1 торр = 1 мм рт. ст. = = $1{,}32 \cdot 10^{-3}$ атм; 1 атм = 760 торр

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

АТОМНАЯ МАССА ЭЛЕМЕНТОВ

Элемент	Символ	Атомный номер	Атомная масса
Азот	N	7	14,01
Алюминий	Al	13	26,98
Аргон	Ar	18	39,55
Барий	Ba	56	137,34
Бериллий	Be	4	9,01
Бор	B	5	10,81
Бром	Br	35	79,90
Ванадий	V	23	50,94
Висмут	Bi	83	208,98
Водород	H	1	1,008
Вольфрам	W	74	183,85
Гадолиний	Gd	64	157,25
Галлий	Ga	31	69,72
Гафний	Hf	72	178,49
Гелий	He	2	4,00
Германий	Ge	32	72,59
Гольмий	Ho	67	164,93
Диспрозий	Dy	66	162,50
Европий	Eu	63	151,96
Железо	Fe	26	55,84
Золото	Au	79	196,97
Индий	In	49	114,82
Иод	I	53	126,91
Иридий	Ir	77	192,22
Иттербий	Yb	70	173,04
Иттрий	Y	39	88,91
Кадмий	Cd	48	112,40
Калий	K	19	39,09
Кальций	Ca	20	40,08
Кислород	O	8	16,00
Кобальт	Co	27	58,93
Кремний	Si	14	28,09
Криптон	Kr	36	83,80
Ксенон	Xe	54	131,30
Лантан	La	57	138,91
Литий	Li	3	6,94
Лютеций	Lu	71	174,97
Магний	Mg	12	24,31
Марганец	Mn	25	54,94
Медь	Cu	29	63,55
Молибден	Mo	42	95,94
Мышьяк	As	33	74,92
Натрий	Na	11	23,00

Элемент	Символ	Атомный номер	Атомная масса
Неодим	Nd	60	144,27
Неон	Ne	10	20,18
Никель	Ni	28	58,71
Ниобий	Nb	41	92,91
Олово	Sn	50	118,69
Осмий	Os	76	190,2
Палладий	Pd	46	106,4
Платина	Pt	78	195,09
Празеодим	Pr	59	140,91
Протактиний	Pa	91	231,04
Радий	Ra	88	226,03
Радон	Rn	86	222
Рений	Re	75	186,2
Родий	Rh	45	102,91
Ртуть	Hg	80	200,59
Рубидий	Rb	37	85,47
Рутений	Ru	44	101,07
Самарий	Sm	62	150,43
Свинец	Pb	82	207,21
Селен	Se	34	78,96
Сера	S	16	32,06
Серебро	Ag	47	107,87
Скандий	Sc	21	44,96
Стронций	Sr	38	87,62
Сурьма	Sb	51	121,75
Таллий	Tl	81	204,39
Тантал	Ta	73	180,95
Теллур	Te	52	127,60
Тербий	Tb	65	158,93
Титан	Ti	22	47,90
Торий	Th	90	232,04
Тулий	Tm	69	169,93
Углерод	C	6	12,01
Уран	U	92	238,03
Фосфор	P	15	30,97
Фтор	F	9	19,00
Хлор	Cl	17	35,45
Хром	Cr	24	52,00
Цезий	Cs	55	132,91
Церий	Ce	58	140,12
Цинк	Zn	30	65,38
Цирконий	Zr	40	91,22
Эрбий	Er	68	167,26

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ЛОГАРИФМЫ

N	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	0000	0043	0086	0128	0170	0212	0253	0294	0334	0374
11	0414	0453	0492	0531	0569	0607	0645	0682	0719	0755
12	0792	0828	0864	0899	0934	0969	1004	1038	1072	1106
13	1139	1173	1206	1239	1271	1303	1335	1367	1399	1430
14	1461	1492	1523	1553	1584	1614	1644	1673	1703	1732
15	1761	1790	1818	1847	1875	1903	1931	1959	1987	2014
16	2041	2068	2095	2122	2148	2175	2201	2227	2253	2279
17	2304	2330	2355	2380	2405	2430	2455	2480	2504	2529
18	2553	2577	2601	2625	2648	2672	2695	2718	2742	2765
19	2788	2810	2833	2856	2878	2900	2923	2945	2967	2989
20	3010	3032	3054	3075	3096	3118	3139	3160	3181	3201
21	3222	3243	3263	3284	3304	3324	3345	3365	3385	3404
22	3424	3444	3464	3483	3502	3522	3541	3560	3579	3598
23	3617	3636	3655	3674	3692	3711	3729	3747	3766	3784
24	3802	3820	3838	3856	3874	3892	3909	3927	3945	3962
25	3979	3997	4014	4031	4048	4065	4082	4099	4116	4133
26	4150	4166	4183	4200	4216	4232	4249	4265	4281	4298
27	4314	4330	4346	4362	4378	4393	4409	4425	4440	4456
28	4472	4487	4502	4518	4533	4548	4564	4579	4594	4609
29	4624	4639	4654	4669	4683	4698	4713	4728	4742	4757
30	4771	4786	4800	4814	4829	4843	4857	4871	4886	4900
31	4914	4928	4942	4955	4969	4983	4997	5011	5024	5038
32	5051	5065	5079	5092	5105	5119	5132	5145	5159	5172
33	5185	5198	5211	5224	5237	5250	5263	5276	5289	5302
34	5315	5328	5340	5353	5366	5378	5391	5403	5416	5428
35	5441	5453	5465	5478	5490	5502	5514	5527	5539	5551
36	5563	5575	5587	5599	5611	5623	5635	5647	5658	5670
37	5682	5694	5705	5717	5729	5740	5752	5763	5775	5786
38	5798	5809	5821	5832	5843	5855	5866	5877	5888	5899
39	5911	5922	5933	5944	5955	5966	5977	5988	5999	6010
40	6021	6031	6042	6053	6064	6075	6085	6096	6107	6117
41	6128	6138	6149	6160	6170	6180	6191	6201	6212	6222
42	6232	6243	6253	6263	6274	6284	6294	6304	6314	6325
43	6335	6345	6355	6365	6375	6385	6395	6405	6415	6425
44	6435	6444	6454	6464	6474	6484	6493	6503	6513	6522
45	6532	6542	6551	6561	6571	6580	6590	6599	6609	6618
46	6628	6637	6646	6656	6665	6675	6684	6693	6702	6712
47	6721	6730	6739	6749	6758	6767	6776	6785	6794	6803
48	6812	6821	6830	6839	6848	6857	6866	6875	6884	6893
49	6902	6911	6920	6928	6937	6946	6955	6964	6972	6981
50	6990	6998	7007	7016	7024	7033	7042	7050	7059	7067
51	7076	7084	7093	7101	7110	7118	7126	7135	7143	7152
52	7160	7168	7177	7185	7193	7202	7210	7218	7226	7235
53	7243	7251	7259	7267	7275	7284	7292	7300	7308	7316
54	7324	7332	7340	7348	7356	7364	7372	7380	7388	7396
N	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

N	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
55	7404	7412	7419	7427	7435	7443	7451	7459	7466	7474
56	7482	7490	7497	7505	7513	7520	7528	7536	7543	7551
57	7559	7566	7574	7582	7589	7597	7604	7612	7619	7627
58	7634	7642	7649	7657	7664	7672	7679	7686	7694	7701
59	7709	7716	7723	7731	7738	7745	7752	7760	7767	7774
60	7782	7789	7796	7803	7810	7818	7825	7832	7839	7846
61	7853	7860	7868	7875	7882	7889	7896	7903	7910	7917
62	7924	7931	7938	7945	7952	7959	7966	7973	7980	7987
63	7993	8000	8007	8014	8021	8028	8035	8041	8048	8055
64	8062	8069	8075	8082	8089	8096	8102	8109	8116	8122
65	8129	8136	8142	8149	8156	8162	8169	8176	8182	8189
66	8195	8202	8209	8215	8222	8228	8235	8241	8248	8254
67	8261	8267	8274	8280	8287	8293	8299	8306	8312	8319
68	8325	8331	8338	8344	8351	8357	8363	8370	8376	8382
69	8388	8395	8401	8407	8414	8420	8426	8432	8439	8445
70	8451	8457	8463	8470	8476	8482	8488	8494	8500	8506
71	8513	8519	8525	8531	8537	8543	8549	8555	8561	8567
72	8573	8579	8585	8591	8597	8603	8609	8615	8621	8627
73	8633	8639	8645	8651	8657	8663	8669	8675	8681	8686
74	8692	8698	8704	8710	8716	8722	8727	8733	8739	8745
75	8751	8756	8762	8768	8774	8779	8785	8791	8797	8802
76	8808	8814	8820	8825	8831	8837	8842	8848	8854	8859
77	8865	8871	8876	8882	8887	8893	8899	8904	8910	8915
78	8921	8927	8932	8938	8943	8949	8954	8960	8965	8971
79	8976	8982	8987	8993	8998	9004	9009	9015	9020	9025
80	9031	9036	9042	9047	9053	9058	9063	9069	9074	9079
81	9085	9090	9096	9101	9106	9112	9117	9122	9128	9133
82	9138	9143	9149	9154	9159	9165	9170	9175	9180	9186
83	9191	9196	9201	9206	9212	9217	9222	9227	9232	9238
84	9243	9248	9253	9258	9263	9269	9274	9279	9284	9289
85	9294	9299	9304	9309	9315	9320	9325	9330	9335	9340
86	9345	9350	9355	9360	9365	9370	9375	9380	9385	9390
87	9395	9400	9405	9410	9415	9420	9425	9430	9435	9440
88	9445	9450	9455	9460	9465	9469	9474	9479	9484	9489
89	9494	9499	9504	9509	9513	9518	9523	9528	9533	9538
90	9542	9547	9552	9557	9562	9566	9571	9576	9581	9586
91	9590	9595	9600	9605	9609	9614	9619	9624	9628	9633
92	9638	9643	9647	9652	9657	9661	9666	9671	9675	9680
93	9685	9689	9694	9699	9703	9708	9713	9717	9722	9727
94	9731	9736	9741	9745	9750	9754	9759	9763	9768	9773
95	9777	9782	9786	9791	9795	9800	9805	9809	9814	9818
96	9823	9827	9832	9836	9841	9845	9850	9854	9859	9863
97	9868	9872	9877	9881	9886	9890	9894	9899	9903	9908
98	9912	9917	9921	9926	9930	9934	9939	9943	9948	9952
99	9956	9961	9965	9969	9974	9978	9983	9987	9991	9996
N	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

ОТВЕТЫ

Глава 24

1. 8,0 ккал; 0,60 молей
2. Секрет поджелудочной железы содержит HCO_3^- в высокой концентрации; благодаря этому при смешивании с желудочным соком устанавливается оптимальный для действия ферментов pH.
3. Поскольку β-казеин обладает слабо выраженной третичной структурой и его нативная конформация напоминает беспорядочный клубок, все части белковой цепи легко доступны действию пепсина и ферментов поджелудочной железы. В отличие от этого α-кератины обладают высокоорганизованной вторичной и третичной структурой с многочисленными —S—S-мостиками; поэтому денатурация этих белков при низком pH желудка ограничена, доступность пептидных связей действию пищеварительных ферментов затруднена и гидролиз идет медленно.
4. а) В кислой среде желудка активация пепсиногена происходит спонтанно. Образующийся пепсин катализирует активацию оставшихся молекул пепсиногена. б) Пепсиноген образуется и запасается в главных клетках слизистой желудка (слабощелочная среда) в форме неактивного предшественника. Отщепляющийся от пепсиногена фрагмент прочно связывается с активным центром пепсина, действуя в качестве ингибитора.
5. Протеолитические ферменты, секретируемые поджелудочной железой, не разрушают эпителиальные клетки тонкого кишечника, потому что: а) концентрация поступившего с пищей белка выше, чем концентрация белка на поверхности эпителиальных клеток; б) ферменты поджелудочной железы после завершения переваривания пищи подвергаются самоперевариванию; в) секреция ферментов поджелудочной железы регулируется гормонами, причем секреция происходит только тогда, когда в желудок попадает пища с высоким содержанием белка; г) эпителиальные клетки тонкого кишечника выделяют слой слизи, защищающий поверхность клеток.
6. В процессе пищеварения белки расщепляются на меньшие полипептиды с помощью панкреатических эндопептидаз. Следовательно, на завершающих этапах пищеварения эффективность карбоксипептидазы возрастает за счет увеличения количества COOH-концов.
7. Ответственное за симптомы вещество — лактоза. Способность секретировать лактазу – фермент, гидролизующий лактозу,– снижается с возрастом. Неусвоенная лактоза проходит через тонкий кишечник в толстый кишечник, где она сбраживается кишечными бактериями.
8. Если в испражнениях обнаруживаются липиды, содержащие негидролизованные триацилглицеролы, то вероятной причиной стеатореи может служить недостаточная секреция липазы поджелудочной железой. Если в липидах испражнений присутствуют гидролизованные триацилглицеролы, то вероятной причиной стеатореи может оказаться недостаточная секреция желчи, поскольку соли желчных кислот необходимы для всасывания питательных веществ.
9. Повышенная концентрация аланина и глутамина свидетельствует о важности глюкозо-аланинового цикла и переноса аммиака, осуществляемого при помощи глутамина.
10. Почти две трети ATP, синтезируемой в почках, используется для транспорта ионов.
11. Антимицин А и иодацетат ингибируют транспорт электронов и гликолиз соответственно. Источником энергии для сокращения служит запас креатинфосфата.
12. Постоянный уровень ATP поддерживается за счет переноса фосфата от креатинфосфата. Фтор-2,4-динитробензол ингибирует креатинкиназу.
13. Аммиак очень токсичен для нервной ткани, особенно для мозга. Избыток аммиака

удаляется за счет перевода глутамата в глутамин, который направляется в печень и затем превращается в мочевину. Дополнительное количество глутамина образуется в результате превращения глюкозы в глутамат через α-кетоглутарат, причем аммиак удаляется как в самом этом процессе, так и при превращении Glu в Gln.

14. Глюкоза $\xrightarrow{\text{Гликолиз}}$ Дигидроксиацетонфосфат $\xrightarrow{NADH\ +\ H^+}$ Глицерол-3-фосфат + NAD^+ → Триацилглицеролы
15. Количество циркулирующего альбумина зависит от общего объема плазмы. Потеря альбумина у больных с патологией почек приводит к разнице в осмотическом давлении между плазмой крови и внеклеточной жидкостью, что обусловливает отток воды из клеток во внеклеточное пространство.
16. Секреция поджелудочной железы зависит от состава и количества пищи, в особенности от содержания в ней белков. Уменьшение потребления жидкости, калорий и электролитов компенсируют путем внутривенного введения физиологического раствора с глюкозой. При раздражении ткани поджелудочной железы снижается секреция инсулина, что приводит к развитию гипергликемии.
17. Большая физическая нагрузка требует увеличения выработки ATP, что удовлетворяется за счет повышенного потребления кислорода. Во время спринта мышцы превращают часть гликогена в лактат. По окончании спринта лактат переносится в печень, где он снова превращается в глюкозу и гликоген. Для этого процесса требуется ATP, а следовательно, и кислород в дополнительном по сравнению с состоянием покоя количестве.
18. Для сохранения нейтральности мочи выделение фосфата (PO_4^{3-}) должно сопровождаться выделением положительных противоионов (Na^+ или H^+). Чтобы уменьшить потерю Na^+ при выведении фосфата, натрий в дистальных канальцах обменивается на протон. В результате повышается концентрация протонов в моче.
19. а) При отравлении наркотиками неглубокое и неровное дыхание приводит к накоплению CO_2 в легких. Увеличение концентрации CO_2 сдвигает приведенную ниже реакцию вправо, понижая pH плазмы крови:

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3 \rightleftarrows H^+ + HCO_3^-$$

б) Механическая вентиляция легких снижает концентрацию CO_2 и сдвигает равновесие влево. В результате повышается pH плазмы крови в легких, что способствует увеличению сродства гемоглобина к кислороду. в) Бикарбонат повышает pH и увеличивает буферную емкость плазмы крови.

20. Глюкоза служит основным топливом мозга. Ключевая реакция в катаболизме глюкозы – это тиаминпирофосфатзависимое окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-CoA. Поэтому недостаток тиамина снижает утилизацию глюкозы мозгом.
21. В ходе обратного всасывания в почечных канальцах активный транспорт Na^+ осуществляется Mg^{2+}-зависимой Na^+, K^+-ATPазой. В этом сопряженном процессе поглощение трех ионов Na^+ происходит одновременно с выделением двух ионов K^+.
22. Если выпить большое количество морской воды, то общая концентрапия электролитов во внеклеточной жидкости окажется гораздо выше, чем внутри клеток. Такой градиент концентрации вызывает отток воды из клеток во внеклеточное пространство. По мере обезвоживания клеток нежные внутриклеточные органеллы (например, митохондрии) съеживаются и в конце концов необратимо повреждаются.

Глава 25

1. $1{,}87 \cdot 10^2$ м^2 (приблизительно два футбольных поля).
2. Быстрая инактивация служит средством быстрого уменьшения концентрации гормона. Постоянство концентрации инсулина поддерживается за счет равенства скоростей его синтеза и деградации. Кроме того, содержание гормонов в крови может регулироваться путем изменения скорости высвобождения запасенных гормонов, а также скорости транспорта и превращения прогормона в активный гормон.
3. Из-за низкой растворимости в липидах водорастворимые гормоны не проходят через клеточную мембрану. Вместо этого они связываются с рецептором на поверхности клетки. В случае адреналина такой рецептор представляет собой фермент, катализирующий образование внутри клетки второго посредника - циклического AMP (cAMP). Наоборот, жирорастворимые гормоны легко могут проникать через гидрофобную внутреннюю часть клеточной мембраны. Оказавшись внутри клетки, они могут воз-

действовать непосредственно на внутриклеточные рецепторы.

4. а) Поскольку аденилатциклаза – белок, связанный с мембраной, при центрифугировании препаратов аденилатциклазная активность осаждается во фракции частиц. б) Адреналин стимулирует образование сАМР – растворимого вещества, активирующего гликоген-фосфорилазу. в) сАМР – устойчивое к нагреванию соединение. Его можно получить, обрабатывая АТР гидроксидом бария.
5. В отличие от сАМР дибутирил-сАМР проходит сквозь клеточную мембрану.
6. Холерный токсин повышает уровень сАМР в эпителиальных клетках кишечника. Приведенные факты свидетельствуют о том, что сАМР регулирует проницаемость мембраны для ионов Na^+. Лечение холеры состоит в возмещении потерь жидкости и электролитов в организме.
7. а) В сердце и скелетной мышце отсутствует фермент глюкозо-6-фосфатаза. Следовательно, каждая образующаяся молекула глюкозо-6-фосфата направляется по гликолитическому пути и в условиях недостатка кислорода превращается в лактат. а) Электрический заряд, свойственный всем фосфорилированным интермедиатам, препятствует их выходу из клетки, так как мембрана непроницаема для заряженных молекул. В стрессовой ситуации концентрация гликолитических предшественников в мышечной ткани должна быть высокой для обеспечения предстоящей мышечной работы. Накопление предшественников в фосфорилированном состоянии препятствует их утечке из мышечной ткани. Печень, наоборот, поставляет глюкозу, сохраняя необходимый уровень ее в крови. Следовательно, в стрессовой ситуации глюкоза должна быстро поступать из клеток печени в кровь, что обеспечивается реакцией дефосфорилирования, катализируемой глюкозо-6-фосфатазой.
8. Избыточная секреция инсулина поджелудочной железой способствует повышенной утилизации печенью глюкозы, находящейся в крови; это приводит к гипогликемии. Кроме того, при высоком содержании инсулина происходит замедление катаболизма аминокислот и жирных кислот. Таким образом, в крови больных оказывается мало субстратов энергетического обмена, необходимых для образования АТР. Если состояние гиперинсулинизма продолжается долго, то возникает поражение клеток мозга, поскольку глюкоза служит для мозга основным источником энергии.
9. Тот факт, что при инкубации ткани печени с тироксином увеличивается интенсивность дыхания и теплообразования и не изменяется концентрация АТР, согласуется с утверждением, что тироксин является разобщителем окислительного фосфорилирования. Разобщающие агенты понижают отношение Р/О в тканях; это заставляет ткани увеличивать интенсивность дыхания, чтобы удовлетворить потребность в АТР. Наблюдаемое выделение тепла могло быть обусловлено также повышением скорости утилизации АТР тканью, стимулированной тироксином. В такой ткани возросшая потребность в АТР удовлетворяется за счет повышения уровня окислительного фосфорилирования (дыхания), что сопровождается выделением тепла. Несмотря на многочисленные исследования, детали регуляции тиреоидными гормонами скорости аэробного метаболизма остаются загадкой.
10. Женские половые гормоны (эстрогены) способствуют развитию у женщин вторичных половых признаков. Один из таких признаков – рост и развитие молочной железы. Поскольку карцинома поражает ткань молочной железы, любое воздействие, тормозящее рост этой ткани, замедляет развитие карциномы. Торможение роста ткани молочной железы происходит при снижении концентрации эстрогенов, этого достигают путем удаления яичников. Иногда при лечении используют гормон-антагонист, т.е. гормон, который обладает противоположным по отношению к эстрогенам действием, например тестостерон.
11. Надпочечники, которые располагаются непосредственно над почками, представляют собой по существу часть нервной системы, от которой они получают сигналы. Следовательно, нет ничего удивительного в том, что синтез эндорфинов осуществляется как мозгом, так и мозговым веществом надпочечников.
12. Некоторые полипептидные гормоны, а именно инсулин и глюкагон синтезируются в виде неактивных предшественников, полипептидные цепи которых длиннее цепей самих активных гормонов. Образование прогормона дает то преимущество, что, будучи неактивным, прогормон может запасаться в большом количестве в секреторных гранулах и быстро активироваться в ответ на соответствующий сигнал путем ферментативного расщепления.
13. Адреналином лечат больных, страдающих

тяжелой формой астмы, потому что этот гормон снимает спазм гладкой мускулатуры, окружающей бронхиолы легких, стимулируя образование в клетках-мишенях cAMP. Однако при гидролизе фосфодиэстеразой cAMP разрушается. Поскольку производные пурина–кофеин, теофиллин и аминофиллин ингибируют фосфодиэстеразу, прием этих лекарств пролонгирует действие адреналина и повышает его активность за счет уменьшения скорости расщепления cAMP.

14. Эти наблюдения указывают на то, что активность фосфодиэстеразы стимулируется ионами Ca^{2+}, действие которых опосредовано кальмодулином. Это согласуется с известным фактом, что кальмодулин представляет собой Ca^{2+}-связывающий белок. Связывание комплекса кальмодулин–Ca^{2+} с фосфодиэстеразой стимулирует ее гидролитическую активность по отношению к cAMP.

Глава 26

1. Для гарантии.
2. 0,21 моля ATP/г глюкозы, 0,50 моля ATP/г пальмитиновой кислоты; 4,2 ккал/г глюкозы, 9,5 ккал/г пальмитиновой кислоты; сравнение двух результатов

$$\frac{0{,}50 \text{ моля ATP/г}}{0{,}21 \text{ моля ATP/г}} = 2{,}4 \qquad \frac{9{,}5 \text{ ккал/г}}{4{,}2 \text{ ккал/г}} = 2{,}3$$

показывает, что соотношение количеств образовавшегося ATP и выделившегося тепла одинаково.

3. В первые несколько часов после начала голодания содержание глюкозы в крови начинает падать, поскольку глюкоза поглощается тканями. Чтобы поддержать концентрацию глюкозы в крови на требуемом уровне, организм человека приводит в действие катаболизм глюкогенных аминокислот. Этот процесс связан с выведением азота в виде мочевины и сопровождается одновременным выведением большого количества воды из организма. В последующие несколько дней голодания организм для удовлетворения своих энергетических потребностей переключается с катаболизма аминокислот на катаболизм жирных кислот, и поэтому ежедневная потеря воды в значительной мере снижается.
4. Ожирение–это результат потребления организмом избыточного количества калорий. В данном количестве пища, богатая жирами, может с большей вероятностью привести к ожирению, чем пища с большим содержанием сахара, так как первая обладает большей калорийностью в расчете на грамм. Однако, как правило, ожирение вызывается потреблением слишком большого суммарного количества калорий. Поскольку потребление сладостей доставляет удовольствие, главной опасностью для тучных людей служит пища с очень высоким содержанием сахара.
5. а) 3,16 ккал/г; б) 4,21 ккал/г. в) Исходя из имеющейся информации, можно сделать вывод, что пшеничные хлопья представляют собой смесь белка и углевода. Анализ элементарного состава свидетельствует о том, что азота в образце мало, так что основной компонент хлопьев–это углеводы. г) При окислении в организме выделится столько же энергии, сколько при окислении в калориметре только в том случае, если пища полностью переварена и усвоена.
6. Ее рацион не должен превышать следующий: 3,2 печеные картофелины; 19,2 жареного ломтика картофеля (среднего размера); 26,3 картофельных «чипсов» (среднего размера); 4,8 куска белого хлеба; 6 кусочков масла; 1,6 банки пива.
7. Если в рационе недостает одной из незаменимых аминокислот, то белковый синтез будет продолжаться до тех пор, пока запас этой аминокислоты не истощится. Чтобы пополнить запас, необходимо дополнительное потребление несбалансированной смеси аминокислот или разрушение белков организма. При этом неизбежно возникнет избыток других аминокислот, которые должны подвергнуться катаболизму, что приведет к выделению азота и в результате к отрицательному азотному балансу.
8. Крысу сажают на тщательно контролируемую диету, содержащую все аминокислоты, за исключением Phe. Чтобы на протяжении серии экспериментов поддерживать общее потребление азота на постоянном уровне, к пище добавляют соответствующее количество мочевины. Поскольку крысе недостает одной из аминокислот, будет наблюдаться отрицательный азотный баланс, т. е. количество поступающего с пищей азота будет меньше, чем количество выделяющегося азота (см. вопрос 7). Затем к пище добавляют Phe и снова измеряют баланс азота. Минимальная дневная потребность равна количеству Phe, необходимого для установления нормального (или слегка положительного) баланса.
9. Для маленьких детей, страдающих квашиоркором, характерен вздутый живот,

что обусловлено задержкой воды в межклеточном пространстве; это в свою очередь вызвано недостаточным содержанием сывороточного альбумина в плазме крови. При переходе на диету с достаточным содержанием белка уровень сывороточного альбумина возвращается к норме, перепад в осмотическом давлении меняет свое направление на противоположное и вода уходит из организма. Следовательно, уменьшение веса в начальный период лечения объясняется потерей воды.

10. Больным с почечной недостаточностью нужен регулярный диализ для удаления из крови токсичных «шлаков», главным образом мочевины и мочевой кислоты. Чтобы уменьшить зависимость больного от этой процедуры, следует свести к минимуму выделение азота. Это достигается с помощью диеты, которая сбалансирована по общему количеству аминокислот и по их относительному содержанию, т. е. пища должна состоять из белков с биологической ценностью, близкой к 100. Поскольку в яйцах содержатся все незаменимые аминокислоты и биологическая ценность яиц выше, чем зерна, с питательной точки зрения яйца более сбалансированы, чем зерно, и служат лучшей пищей для больных.
11. Витамин B_6 – пиридоксин – используется при синтезе кофермента пиридоксальфосфата. Этот кофермент необходим для трансаминаз – ферментов, катализирующих первую стадию катаболизма аминокислот.
12. Желудочно-кишечные бактерии поставляют организму-хозяину значительную часть необходимых витаминов (бактерии синтезируют их сами). Пища, снижающая численность популяции кишечных бактерий, может привести к недостатку в витаминах.
13. Людям необходима сбалансированная пища для того, чтобы удовлетворить свои биохимические потребности в энергии и чтобы обеспечить организм «строительным материалом» и кофакторами для процессов биосинтеза. Эти потребности можно удовлетворить, используя пищу из множества различных источников; нет никаких данных в пользу того, что для правильного питания нужна какая-либо особая пища (например, молоко).
14. а) Пища должна содержать запас «топлива», достаточный для выполнения тяжелой работы и поддержания температуры тела. б) Пищу, которая обеспечивает создание запасов гликогена, т.е. легкорасщепляемые углеводы (мед, сушеные фрукты, шоколад, блины и т. п.). в) Белки и жиры. г) Возможно, ионы Na^+ и K^+.
15. Млекопитающие, в том числе и человек, не обладают способностью превращать двухуглеродные соединения (ацетил-CoA) в трехуглеродные (пируват), необходимые для глюконеогенеза. Поэтому хотя этанол превращается в ацетил-CoA, последний не может превратиться в глюкозу.
16. 7,2 кг.
17. а) При гидролизе белка в тонком кишечнике образуется смесь аминокислот. Эти аминокислоты можно разделить на две категории: глюкогенные (в процессе катаболизма из их углеродного скелета получается пируват) и кетогенные (при катаболизме из их углеродного скелета образуется ацетил-CoA). Поскольку пируват превращается в ацетил-CoA, использование углеродного скелета всех аминокислот может привести к образованию жирных кислот и, следовательно, к отложению триацилглицеролов. б) Катаболизм аминокислот сопровождается выделением азота в виде мочевины, а также потреблением и выделением больших количеств воды.

Глава 27

1. Одна ДНК содержит 32% A, 32% T, 18%G и 18% C; другая – 17% A, 17% T, 33% G и 33% C. Из этого следует, что обе ДНК – двухцепочечные. ДНК, содержащая 33% G и 33% C, должна принадлежать термофильной бактерии, поскольку именно такая ДНК более устойчива к нагреваиию. Пары оснований G–C обладают тремя водородными связями и потому являются более прочными, чем пары оснований A-T, у которых только две водородные связи
2. (5′)GAATGCATACGGCAT(3′).
3. 0,94 мг.
4. 372 пары оснований; действительная длина, вероятно, гораздо больше, так как почти все эукариотические гены содержат интроны, которые могут быть длиннее, чем экзоны; большинство эукариотических генов кодирует также лидирующую, или сигнальную, последовательность своего белкового продукта.
5. 200 000 пар оснований; общая длина ДНК фага T2 составляет 68 000 нм, тогда как размер головки фага всего 100 нм.
6. Отношение длины ДНК к диаметру составляет 6,8 для нуклеосомы и 10^5 для ядра. В ядре ДНК уложена гораздо более компактно.

7. Невероятно, поскольку такой палиндром не имеет максимального числа пар оснований. В хромосоме интактной клетки могут быть участки ДНК, в которых отрицательные заряды фосфатных групп остова ДНК нейтрализуются гистонами, что сделает ДНК более гибкой и позволит ей принять крестообразную структуру.
8. ДНК фага М13 одноцепочечная, поскольку количество А не соответствует количеству Т, а количество G не эквивалентно количеству С.
9. а) Одноцепочечная линейная ДНК, размер которой равен длине разорванной цепи РФII, и одноцепочечная кольцевая ДНК, т.е. интактная цепь РФII. б) Будут обнаружены три линейные одноцепочечные ДНК. Одна, представляющая собой неразорванную цепь РФII, состоит из 5386 оснований; две другие, образовавшиеся из разорванной цепи, будут иметь меньший размер.
10. Если не пометить 5'-конец ДНК, не будет точки отсчета, необходимой для восстановления исходной последовательности оснований.
11. Нет; две цепи двухцепочечной ДНК различаются по нуклеотидному составу (см. рис. 27-12).
12. Экзоны этого гена состоят из $3 \times 192 = 576$ пар оснований. Оставшиеся 864 нуклеотидные пары входят в состав интронов и, возможно, в состав лидирующей, или сигнальной, последовательности.
13. Центрифугирование этих двух ДНК в градиенте плотности хлористого цезия покажет, что ДНК *E. coli*, у которой содержание G—C-пар выше, будет тяжелее и поэтому достигнет равновесия в более низкой точке градиента, чем ДНК морского ежа (см. табл. 27-3).
14. «Глазки» образовались в результате расплетания участков двухцепочечной ДНК, богатых А—Т-парами. Эти участки менее устойчивы к нагреванию, чем пары G—C. Описанная процедура полезна при определении различий в составе оснований вдоль молекулы двухцепочечной ДНК.
15. На основании того, что гомологичные белки различных видов животных обладают гомологией аминокислотных последовательностей.
16. а)

—A—T—G—C—T—A—G—C—A—T—

●

—T—A—C—G—A—T—C—G—T—A—

б) Это центр осевой симметрии второго порядка, поскольку поворот на 180° вокруг этой точки приводит к той же самой нуклеотидной последовательности оснований. в) Очевидно, эндонуклеаза при рестрикции образовала выступающие концы, которые удерживаются вместе за счет собственной «липкости». Поэтому ДНК остается в форме кольца. г) Щелочная среда приводит к раскручиванию кольцевой двухцепочечной ДНК и разделению липких концов; в результате образуются две линейные одиночные цепи.
17. Нет; центральная догма молекулярной генетики гласит, что генетическая информация передается от ДНК к РНК и далее от РНК к белку. В РНК-содержащих вирусах генетическая информация также передается в направлении РНК → белок, хотя и без участия ДНК.

Глава 28

1. Если бы репликация происходила по дисперсивному механизму, то плотность ДНК после первого удвоения соответствовала бы наблюдаемой в опыте и такая ДНК занимала бы промежуточное место между «тяжелой» и «легкой» фракциями. Однако после второго удвоения все молекулы ДНК имели бы одну и ту же плотность и давали бы одну полосу, лежащую посредине между той полосой, что наблюдалась после первого удвоения, и полосой «легкой» ДНК.
2. а) Поскольку остатки тимидина присутствуют в ДНК и отсутствуют в РНК, меченая РНК не мешала проведению эксперимента. б) Гуанозин и аденозин не подходят, поскольку они присутствуют и в ДНК, и во всех РНК. в) Тимидин фосфорилируется с помощью АТР и в несколько стадий превращается в тимидин-5'-трифосфат.

Тимидин + АТР → Тимидин-5'-фосфат + + ADP

TMP + ATP → TDP + ADP

TDP + ATP → TTP + ADP

3. 400 000 оборотов.
4. а) 44 мин. б) Одна возможность состоит в том, что хромосома *E. coli* реплицируется четырьмя репликативными вилками из двух точек начала репликации.
5. а) 0,42. б) число пар оснований в интронах и в лидирующей, или сигнальной, последовательности.
6. а) (5') CTAATGCAACGTTGCAAGCT (3')
   б) (5') AGCUUGCAACGUUGCAUUAG (3')
7. а) A – 21%, U – 21%, G – 29%, C – 29%. б) Он может оказаться таким же, как и в п. а), но не обязательно.

8. Новая ДНК, синтезированная на данной матрице, содержит 32,7% A, 18,5% G, 24,1% C и 24,7% T. Новая ДНК, полученная на матрице, комплементарной данной, содержит 24,7% A, 24,1% G, 18,5% C и 32,7% T. Суммарный нуклеотидный состав двух новых ДНК таков: A – 28,7%, G – 21,3%, C – 21,3% и T – 28,7%. Необходимо допустить, что на обеих матричных цепях процесс репликации прошел полностью.
9. РНК транскрибируются только с одной цепи двухцепочечной ДНК.
10. а) Около 2000. б) Фрагменты Оказаки синтезируются ДНК-полимеразой III на матричной ДНК с помощью РНК-затравки. Поскольку фрагменты Оказаки в *E. coli* составляют около 2000 оснований, они прочно связаны с матричной цепью за счет комплементарного взаимодействия. Каждый фрагмент быстро присоединяется к отстающей цепи в результате последовательного действия ДНК-полимеразы I и ДНК-лигазы; тем самым обеспечивается правильный порядок фрагментов. Вот почему в ходе нормальной репликации не образуется смеси разных фрагментов Оказаки, находящихся в отделенном от матрицы состоянии.
11. *Ведущая цепь*
Предшественники: dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Ферменты: ДНК-гираза, хеликаза, ДНК-связывающие белки, ДНК-полимераза III, неорганическая пирофосфатаза
Кофакторы: Zn^{2+}, Mg^{2+}
Отстающая цепь
Предшественники: ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Ферменты: ДНК-гираза, хеликаза, ДНК-связывающие белки, примаза, ДНК-полимераза III, ДНК-полимераза I, ДНК-лигаза, пирофосфатаза
Кофакторы: Zn^{2+}, Mg^{2+}, NAD^+
12. а) Во-первых, уотсон-криковское комплементарное взаимодействие оснований; во-вторых, гидрофобная стабилизация уложенных в стопку пар оснований; в-третьих, ферментативный гидролиз пирофосфата, образующегося в ДНК-полимеразной реакции, что гарантирует прохождение реакции на каждом этапе практически до конца; в-четвертых, удаление неправильно встроенных нуклеотидов за счет 3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы III.
б) Поскольку четыре фактора, обеспечивающие точность репликации, действуют и на ведущей, и на отстающей цепи, считается, что обе цепи синтезируются с одинаковой точностью. Однако, поскольку в образование отстающей цепи вовлечено большее количество отдельных химических реакций, можно ожидать, что именно при ее репликации возникает больше возможностей для появления ошибок.
13. а) Это свойство гарантирует, что чужеродная интактная кольцевая ДНК не сможет реплицироваться (например, в клетках *E. coli*), за исключением того случая, когда ее точка начала репликации идентична таковой у *E. coli*. б) ДНК-репликаза должна реплицировать хромосому *E. coli*, начиная с области, называемой точкой начала репликации и имеющей характерную последовательность оснований.
14. а) Участие NTP в РНК-полимеразной реакции ведет к образованию пирофосфата, который расщепляется далее пирофосфатазой, что сдвигает реакцию в сторону завершения синтеза и обеспечивает высокую точность последнего. В полинуклеотидфосфорилазной реакции участвует NDP, и, таким образом, освобождается фосфат. Поскольку концентрация фосфата в клетках сравнительно высока, вполне вероятно, что полинуклеотидфосфорилаза работает в обратном направлении, т. е. разрушает РНК. б) РНК-полимеразе необходимы все четыре NTP и матрица, тогда как полинуклеотидфосфорилаза не требует участия всех четырех NDP и матрицы; это еще раз подтверждает, что ее роль – деградация РНК.
15. Ошибка в одном основании при репликации ДНК, если она не исправлена, приведет к тому, что одна из двух дочерних клеток, а также все ее потомки будут содержать измененную хромосому. Ошибка в одном основании, совершенная РНК-полимеразой, повлечет за собой синтез некоторого количества неправильных копий одного белка. При этом, поскольку пул мРНК в клетке быстро обновляется, большинство молекул этого белка будет нормальным. Потомство такой клетки тоже будет нормальным.

Глава 29

1. а) Gly—Gln—Ser—Leu—Leu—Ile;
б) Leu—Asp—Ala—Pro; в) His—Asp—Ala—Cys—Cys—Tyr; г) Met—Asp—Glu у эукариот; fMet—Asp—Glu у прокариот.
2. Поскольку почти всем аминокислотам соответствует несколько кодонов (лейци-

ну, например, шесть), любой данный полипептид может кодироваться большим числом различных нуклеотидных последовательностей.

3. UUAAUGUAU, UUGAUGUAU, CUUAUGUAU, CUCAUGUAU, CUAAUGUAU, CUGAUGUAU, UUAAUGUAC, UUGAUGUAC, CUUAUGUAC, CUCAUGUAC, CUAAUGUAC, CUGAUGUAC.
4. а) (5') CGACGGCGCGAAGUCAGGGGUGUUAAG (3').

   б) Arg—Arg—Arg—Glu—Val—Arg—Gly—Val—Lys.

   в) Нет, так как комплементарные антипараллельные цепи в двухцепочечной ДНК имеют разные последовательности оснований в направлении 5'→3'. РНК транскрибируется только с одной определенной цепи двухцепочечной ДНК. Поэтому РНК-полимераза должна узнавать нужную цепь и связываться с ней.
5. Для метионина существуют две тРНК: одна – инициирующая тРНК^{fMet}, а другая – тРНК^{Met}, которая может переносить метионин во внутренние положения полипептида. С помощью метиониновой аминоацил-тРНК синтетазы тРНК^{fMet} взаимодействует с метионином, образуя метионил-тРНК^{fMet}. Затем аминогруппа этого метионина формилируется с помощью N^{10}-формилтетрагидрофолата с образованием N-формилметионил-тРНК^{fMet}. Свободный метионин или метионил-тРНК^{Met} формилироваться не могут. С инициирующим кодоном AUG на мРНК может связываться только N-формилметионил-тРНК^{fMet}, поскольку она узнает особый инициирующий сигнал. Этот сигнал представляет собой область, состоящую из шести или больше остатков А и G, расположенных перед AUG. Метионил-тРНК^{Met} не умеет распознавать этот сигнал. AUG во внутренних положениях мРНК может связывать только метионил-тРНК.
6. Следует добавить полинуклеотидфосфорилазу к смеси UDP и CDP, в которой UDP содержится, скажем, в пять раз больше, чем CDP. В результате получится РНК-подобный полимер, в котором будет много триплетов UUU (кодирующих Phe) и небольшое количество UUC (Phe), UCU (Ser) и CUU (Leu), а также (но в гораздо меньших количествах) UCC (тоже Ser), CCU (Pro) и CUC (Leu).
7. По меньшей мере 583 высокоэнергетические фосфатные группы; может быть и больше в зависимости от количества ошибок, выявленных и исправленных аминоацил-тРНК-синтетазами. На исправление каждой ошибки затрачиваются две высокоэнергетические фосфатные группы.
8. Чтобы синтезировать из аминокислот белок, эукариотическая клетка должна осуществить синтез как минимум 20 активирующих ферментов, 70 рибосомных белков, 4 рибосомных РНК, не менее 20 тРНК и не менее 10 вспомогательных ферментов. В то же время для синтеза $\alpha(1\rightarrow4)$-цепи гликогена из глюкозы необходимо всего 4–5 ферментов.
9.

Глициновые кодоны	Узнаются антикодонами		
(5') GGU	(5') ACC	и	(5') GCC
GGC	GCC		ICC
GGA	UCC		ICC
GGG	CCC		UCC

   а) На 5'-конце и в середине антикодона. б) «Качающиеся» пары оснований будут образовывать со своими кодонами антикодоны (5')GCC, ICC и UCC. в) В парах, в образовании которых принимают участие антикодоны (5')ACG, GCC, UCC и CCC. г) Наименее вероятно использование пар, в которых участвуют антикодоны, указанные в п. в), поскольку тРНК, содержащие эти антикодоны, из-за прочного связывания всех трех антикодоновых оснований будут освобождаться из комплекса с более низкой скоростью, чем другие тРНК для Gly.
10. Она вызовет сдвиг рамки при трансляции, начиная с места прикрепления этой необычной аминоацил-тРНК.
11. (а), (в), (д) и (ж); замены (б), (г) и (е) не могут быть результатом изменения в одном основании; для (б) и (е) требуется замена двух оснований, а для (г) необходимо заменить все три основания.
12. В ДНК два кодона для Glu (5')TTC и (5')CTC и четыре кодона для Val – (5')TAC, (5')CAC, (5')AAC и (5')GAC. Замена аминокислоты в гемоглобине серповидных эритроцитов может быть обусловлена изменением одного основания: (5')TTC (Glu)→(5')TAC (Val) или (5')CTC(Glu) → (5')CAC (Val). Гораздо менее вероятны изменения двух оснований: (5')TTC → (5')CAC, (5')AAC и (5')GAC или (5')CTC → (5')TAC, (5')AAC и (5')GAC.

Глава 30

1. а) Повреждение должно быть исправлено ДНК-полимеразой I, которая действует только в направлении 5′ → 3′. б) мРНК состоит из одной цепи, т.е. в ней отсутствует матричная цепь, необходимая для корректировки. в) Двухцепочечные разрывы, обусловленные действием рентгеновских лучей, восстановить нельзя, так как маловероятно, чтобы разорванные концы соединились нужным образом.
2. 1) Никаких изменений, если в результате мутации получился другой кодон для той же аминокислоты; 2) никаких изменений, если мутация произошла в функционально незначимой области внутри интрона. 3) замена аминокислоты, которая приведет к синтезу улучшенного, неизмененного, менее активного или неактивного белка; 4) укорочение белка в результате мутации, превратившей значащий кодон в терминирующий, или удлинение белка за счет мутации, превратившей терминирующий сигнал в кодон для аминокислоты.
3. Получатся следующие продукты (указаны липкие концы, возникшие при расщеплении под действием *Eco* RI):

5′ ATATGAATTCATAT 3′
3′ TATACTTAAGTATA 5′

5′ CGCGGAATTCCCGG 3′
3′ GCGCCTTAAGGGCC 5′

5′ ATATGAATTCCCGG 3′ Новый
3′ TATACTTAAGGGCC 5′

5′ CGCGGAATTCATAT 3′ Новый
3′ GCGCCTTAAGTATA 5′

4. UAA вызовет терминацию синтеза полипептида только в положении 334–336 прокариотической мРНК. В положениях 330–332 и 338–340 UAA не приведет к терминации, поскольку он будет находиться вне правильной рамки считывания. В эукариотической мРНК терминация произойдет в положении 334–336, если перед UAA нет вставочных последовательностей. Если же UAA находится внутри вставочной последовательности, то он, вероятно, не окажет никакого влияния. Если UAA находится в экзоне (но не в первом экзоне), то влияние UAA на белковый продукт будет зависеть от того, сколько нуклеотидов удалено с предыдущими интронами.
5. а) Это одно- или двухцепочечное кольцо. б) Это двухцепочечное кольцо, ибо *Eco* RI не расщепила бы одноцепочечную ДНК. в) $А = 1{,}3 \cdot 10^6$; $Б = 0{,}8 \cdot 10^6$; $В = 0{,}7 \cdot 10^6$; $Г = 0{,}6 \cdot 10^6$. г) Фрагменты В и Г расположены рядом. Из п. в) мы знаем, что фрагменты Б и Г находятся рядом. д) Сайт рестрикции на границе между фрагментами А и Б поврежден.

(0.8) Б
(1.3) А
Г (0.6)
В (0.7)
Eco RI
Hpa I

6. Возможно, экзоны кодируют функциональные домены белков. Определенный экзон, кодирующий один домен данного белка, может объединиться с экзоном, отвечающим за синтез какого-то домена другого белка; при этом возникнет ген, кодирующий новый белок, содержащий домены двух предшествующих.
7. а) 5 мг/л; б) 10^5 молекул; в) 0,5 г.
8. а) Необходимо расщепить две ДНК рестриктирующей эндонуклеазой, смешать и прогреть их, чтобы инактивировать эндонуклеазу, и разделить липкие концы в точках расщепления. Дать смеси остыть, с тем чтобы образовались нековалентные рекомбинанты, после чего сшить их ковалентно с помощью ДНК-лигазы. б) Кроме требуемого кольцевого дуплекса, в котором объединены исходные кольцевые ДНК, образуются побочные продукты: исходные кольцевые ДНК (малая и большая) и две другие кольцевые ДНК, одна из которых является результатом рекомбинации двух больших ДНК, а другая – результатом рекомбинации двух малых ДНК. Кроме того, в смеси будут присутствовать линейные рекомбинанты, образованные двумя большими ДНК, двумя малыми ДНК, а также два типа рекомбинантов, состоящих из малой и большой ДНК, которые соединены в двух разных сочетаниях.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Абсолютная конфигурация. Расположение четырех различных замещающих групп вокруг асимметрического атома углерода, рассматриваемое по отношению к D- и L-глицеральдегиду.

Аденозиндифосфат (ADP). Рибонуклеозид-5'-дифосфат, выполняющий роль акцептора фосфатной группы в энергетическом цикле клетки.

Аденозинтрифосфат (ATP). Рибонуклеозид-5'-трифосфат, участвующий в энергетическом цикле клетки в качестве донора фосфатной группы.

Азотфиксация. Перевод атмосферного азота (N_2) в растворимую биологически доступную форму с помощью азотфиксирующих организмов.

Активация аминокислоты. ATP-зависимое ферментативное образование эфирной связи между карбоксильной группой аминокислоты и 3'-гидроксильной группой соответствующей ей тРНК.

Активность. Истинная термодинамическая активность или потенциал вещества, определяемый по его молярной концентрации.

Активный транспорт. Требующий энергии перенос растворенного вещества через мембрану в направлении более высокой его концентрации.

Активный центр. Участок поверхности фермента, в котором молекула субстрата связывается и претерпевает превращения.

Актин. Белок, из которого состоят тонкие нити мышечных клеток; он присутствует также в большинстве других животных клеток.

Акцептор протонов. Соединение анионной природы, способное присоединять протон от донора протонов.

Акцептор электронов. Вещество, присоединяющее электроны в окислительно-восстановительной реакции.

Акцепторный контроль. Регуляция интенсивности дыхания за счет изменения доступности ADP – акцептора фосфата.

Алкалоз. Метаболические условия, при которых буферная емкость тела по отношению к ионам OH^- уменьшается; обычно алкалоз сопровождается повышением pH крови.

Алкалоиды. Азотсодержащие органические соединения растительного происхождения; часто это вещества основной природы, обладающие высокой биологической активностью.

Аллостерические ферменты. Регуляторные ферменты, каталитическая активность которых меняется при нековалентном связывании специфического метаболита не в каталитическом центре, а в другом участке.

Аллостерический центр. Специфический участок на поверхности молекулы аллостерического фермента (отличный от активного центра), с которым связывается молекула модулятора или эффектора.

Альдоза. Простой сахар, в котором карбонильная группа расположена на одном конце углеродной цепи.

Аминоацил-тРНК. Эфир аминокислоты и тРНК.

Аминоацил-тРНК – синтетаза. Фермент, катализирующий образование аминоацил-тРНК за счет энергии ATP.

Аминокислоты. Карбоновые кислоты с аминогруппой в α-положении, составные элементы белков.

Аминотрансферазы. Группа ферментов, катализирующих перенос аминогрупп от одного метаболита к другому; их называют также трансаминазами.

Амниотическая проба. Процедура отбора амниотической жидкости для выявления генетических отклонений.

Амфиболический путь. Метаболический путь, используемый как для катаболизма, так и для анаболизма.

Амфипатическое соединение. Соединение, молекула которого содержит и полярные, и неполярные области.

Амфотерное соединение. Соединение, способное быть и донором, и акцептором протонов, т. е. способное выполнять роль либо кислоты, либо основания.

Анаболизм. Фаза промежуточного метаболизма, связанная с требующим затрат энергии биосинтезом компонентов клеток из молекул-предшественников.

Анаплеротическая реакция. Ферментативная

реакция, способная пополнить запас промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты.

Анаэроб. Организм, живущий без кислорода.

Ангстрем (Å). Единица длины (10^{-8} см), используемая для обозначения молекулярных размеров.

Анионообменная смола. Полимер с фиксированными на нем группами катионов, применяемый для хроматографического разделения анионов.

Аномеры. Два стереоизомера данного сахара, отличающиеся только по расположению разных атомов и групп относительно карбонильного (аномерного) атома углерода.

Антибиотик. Органическое соединение, синтезируемое и выделяемое различными видами микроорганизмов и растений в межклеточную среду. Антибиотики токсичны для других видов и выполняют, вероятно, защитную функцию.

Антиген. Молекула, способная вызывать синтез специфического антитела у позвоночных.

Антикодон. Специфическая последовательность из трех нуклеотидов в тРНК, комплементарная кодону для аминокислоты в мРНК.

Антипараллельный. Противоположный по направлению (ориентации). Этот термин используется для характеристики относительного направления двух линейных полимеров.

Антитело. Защитный белок, синтезируемый иммунной системой высших организмов; он специфическим образом взаимодействует с чужеродной молекулой (антигеном), которая индуцировала его синтез.

Аппарат Гольджи. Сложная мембранная органелла эукариотических клеток, участвующая в секреции веществ из клетки и в формировании плазматической мембраны.

Асимметрический атом углерода. Атом углерода, ковалентно связанный с четырьмя различными группами и способный образовывать две разные тетраэдрические конфигурации.

АТРаза. Фермент, гидролизующий АТР до ADP и фосфата; его действие обычно сопряжено с процессами, требующими затрат энергии.

АТР-синтетаза. Ферментный комплекс, синтезирующий АТР из ADP и фосфата в ходе окислительного фосфорилирования на внутренней мембране митохондрий.

Ауксотрофный мутант (ауксотроф). Мутант, неспособный синтезировать какое-либо определенное вещество, которое необходимо поэтому добавлять в среду, чтобы обеспечить его нормальный рост.

Аутотроф. Организм, способный жить на очень простых источниках углерода и азота, таких, как углекислый газ и аммиак.

Ацидоз. Метаболические условия, при которых буферная емкость жидкостей организма по отношению к ионам H^+ уменьшается; обычно ацидоз сопровождается понижением pH крови.

Аэроб. Организм, живущий в присутствии воздуха и использующий кислород.

Аэробный. Растущий в присутствии воздуха или кислорода.

Бактериофаг. Вирус, способный реплицироваться в бактериальной клетке.

Белки плазмы. Белки, присутствующие в плазме крови.

Белок. Полимер, состоящий из одной или нескольких полипептидных цепей, для каждой из которых характерны определенная аминокислотная последовательность и определенная молекулярная масса.

Белок, активирующий катаболитные гены (САР). Особый регуляторный белок, контролирующий инициацию транскрипции генов тех ферментов, которые необходимы клетке в отсутствие глюкозы для утилизации некоторых других питательных веществ.

Библиотека генов. Неупорядоченный набор фрагментов ДНК, содержащий всю генетическую информацию данного вида.

Биосфера. Вся живая материя на Земле: на суше, в морях и в атмосфере.

Бислой. Двойной слой ориентированных амфипатических липидных молекул; углеводородные хвосты обращены внутрь бислоя и образуют непрерывную неполярную фазу.

Буфер. Система, способная сопротивляться изменениям pH и состоящая из сопряженной кислотно-основной пары, в которой отношение акцептора к донору протонов равно приблизительно единице.

Вектор. Автономно реплицирующаяся в клетке-хозяине молекула ДНК, к которой можно присоединить фрагмент ДНК, чтобы обеспечить его репликацию; например, плазмида или ДНК умеренного фага.

Вирион. Вирусная частица.

Вирус. Самореплицирующийся инфекционный комплекс нуклеиновой кислоты и белка, содержащий ДНК- или РНК-хромосому и требующий для своей репликации интактную клетку-хозяина.

Витамин. Органическое вещество, которое должно присутствовать в пище в следовых

количествах; большинство витаминов представляет собой составную часть определенных коферментов.

Водородная связь. Сравнительно слабое электростатическое притяжение между электроотрицательным атомом и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом.

Возбужденное состояние. Богатое энергией состояние атома или молекулы, возникающее в результате поглощения энергии.

Восстановительный эквивалент. Общий термин для электрона или для его эквивалента в форме атома водорода или иона водорода.

Восстанавливающий агент (восстановитель). Донор электронов в окислительно-восстановительной реакции.

Восстановление. Приобретение соединением электронов.

Время полужизни. Время, необходимое для распада половины данного вещества.

Всасывание. Поступление продуктов пищеварения из кишечника в кровь.

Вставочная мутация. Мутация, вызванная вставкой дополнительного основания между двумя последовательно расположенными основаниями ДНК.

Вторичная структура белка. Регулярная конформация остова полипептидной цепи.

Второй закон термодинамики. Закон, согласно которому при любом химическом или физическом процессе энтропия Вселенной возрастает.

Вырожденный код. Код, в котором один элемент на каком-то одном языке кодируется несколькими элементами на другом языке.

Высокоэнергетическое соединение. Соединение, гидролиз которого в стандартных условиях сопровождается значительным уменьшением свободной энергии.

Гексоза. Простой сахар, линейный остов которого состоит из шести атомов углерода.

Гель-фильтрация. Хроматографическая процедура для разделения смеси молекул по размеру, основанная на способности пористых полимеров исключать (т.е. не пропускать сквозь поры) растворенные молекулы, превышающие определенный размер.

Гем. Железопорфириновая простетическая группа гемопротеинов.

Гемоглобин. Гемсодержащий белок красных кровяных клеток (эритроцитов), принимающий участие в переносе O_2.

Гемопротеин. Белок, содержащий в качестве простетической группы гем.

Ген. Участок хромосомы, который кодирует одну или несколько полипептидных цепей или молекулу РНК.

Генетическая информация. Наследственная информация, содержащаяся в нуклеотидной последовательности хромосомной ДНК или РНК.

Генетическая карта. Схема, показывающая относительную последовательность и взаимное расположение определенных генов в хромосоме.

Генетический код. Набор кодовых слов (триплетов) в ДНК, кодирующих аминокислоты белков.

Геном. Совокупность всех генов организма.

Гетеротроф. Организм, который требует в качестве источника энергии и углерода сложные молекулы, такие, как глюкоза.

Гетеротропный фермент. Аллостерический фермент, использующий в качестве модулятора не субстрат, а какое-то другое вещество.

Гидролиз. Расщепление молекулы на две или несколько меньших молекул в реакции с водой.

Гидрофильный. «Водолюбивый»; так говорят о полярных или заряженных молекулах либо о группах, которые ассоциируются с водой.

Гидрофобный. «Ненавидящий воду»; так говорят о неполярных молекулах или группах, которые не растворимы в воде.

Гидрофобные взаимодействия. Связывание неполярных групп друг с другом в водных системах, обусловленное стремлением молекул окружающей воды достичь наиболее стабильного состояния.

Гиперхромный эффект. Значительное увеличение поглощения света веществом при изменении его структуры. Этот эффект при 260 нм наблюдается, в частности, при плавлении двухцепочечной ДНК.

Гистоны. Группа основных белков, связанных с хромосомами эукариотических клеток.

Гликолиз. Тип брожения, при котором глюкоза расщепляется на две молекулы пирувата.

Гликолипид. Липид, содержащий углеводную группу.

Гликопротеин. Белок, содержащий по меньшей мере одну углеводную группу.

Глиоксилатный цикл. Разновидность цикла лимонной кислоты, используемая бактериями и рядом растительных клеток для превращения ацетата в сукцинат и в конечном итоге в новый углевод.

Глиоксисома. Мембранный пузырек, содержащий некоторые ферменты глиоксилатного цикла.

Глобулярный белок. Растворимый белок, полипептидная цепь которого плотно сверну-

та в пространстве с образованием глобулы.

Глюкогенные аминокислоты. Аминокислоты, углеродная цепь которых может быть превращена в процессе метаболизма в глюкозу или гликоген.

Глюконеогенез. Биосинтез новых углеводов из неуглеводных предшественников.

Гомологичные белки. Белки с одинаковой функцией и сходными свойствами у разных видов организмов, например гемоглобины.

Гомотропный фермент. Аллостерический фермент, использующий в качестве модулятора свой субстрат.

Гормон. Химическое вещество, которое синтезируется в следовых количествах эндокринной тканью и выполняет роль посредника в регулировании функции другой ткани или органа.

Грамм-молекулярная масса. Масса вещества в граммах, численно равная его молекулярной массе, т.е. это масса 1 моля.

Дальтон. Вес одного атома водорода ($1{,}66 \cdot 10^{-24}$ г).

Двойная спираль. Спираль, образованная двумя комплементарными антипараллельными цепями ДНК или РНК.

Двухосновная кислота. Кислота, способная к диссоциации с образованием двух протонов.

Дегидрогеназы. Ферменты, катализирующие удаление из субстрата двух атомов водорода.

Дезаминирование. Ферментативное удаление аминогрупп из аминокислот.

Дезоксирибонуклеотиды. Нуклеотиды, содержащие в качестве пентозного компонента 2-дезокси-D-рибозу.

Делеционная мутация. Мутация, возникшая в результате утраты одного или большего числа нуклеотидов из гена.

Денатурация. Частичное или полное расплетание полипептидной цепи (цепей) белка с утратой его специфической природной конформации.

Денатурированный белок. Белок, утративший свою природную конформацию под воздействием какого-либо стабилизирующего фактора, например при нагревании.

Диабет сахарный. Болезнь, вызванная нарушением метаболизма из-за нехватки инсулина и характеризующаяся трудностью транспорта глюкозы из крови в клетки при нормальных концентрациях глюкозы.

Диализ. Удаление молекул малого размера из раствора макромолекул за счет диффузии первых в воду через полупроницаемую мембрану.

Диастереоизомеры. Пара стереоизомеров относительно второго асимметрического атома углерода, существующая для каждого из двух изомеров по первому асимметрическому атому углерода.

Диполь. Молекула, обладающая как положительным, так и отрицательным зарядами.

Дисахариды. Углеводы, состоящие из двух ковалентно соединенных моносахаридных единиц.

Дисульфидный мостик. Ковалентная поперечная связь, образующаяся между цистеиновыми остатками двух полипептидных цепей.

Дифференциальное центрифугирование. Разделение клеточных органелл и т.п. за счет различий в скорости их седиментации в центрифуге.

Дифференцировка. Специализация структуры и функции клеток в ходе эмбрионального роста и развития.

Диффузия. Стремление молекул двигаться в направлении более низкой концентрации.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота). Полинуклеотид, обладающий специфической последовательностью дезоксирибонуклеотидных остатков и выполняющий функцию носителя генетической информации.

ДНК-лигаза. Фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-концом одного фрагмента ДНК и 5'-концом другого в условиях, когда оба фрагмента комплементарно спарены с цепью-матрицей.

ДНК-полимераза. Фермент, который катализирует протекающую в присутствии матрицы реакцию синтеза ДНК из предшественников – дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов.

ДНК-репликазная система. Полный набор ферментов и специализированных белков, необходимых для репликации ДНК.

Донор протонов. Вещество, отдающее протон в кислотно-основной реакции, т.е. кислота.

Донор электронов. Донор электронов в окислительно-восстановительной реакции.

Дыхание. Окислительное расщепление молекулы питательного вещества с высвобождением энергии под воздействием кислорода.

Дыхательная цепь. Электронпереносящая цепь, состоящая из последовательности белков – переносчиков электронов, которые переносят электроны от субстрата к молекулярному кислороду в аэробных клетках.

Жгутик. Клеточный отросток, участвующий в передвижении клетки.

Желчные соли. Амфипатические производные стероидов, обладающие детергентными свойствами и участвующие в пищеварении и усвоении липидов.

Жирная кислота. Алифатическая кислота с длинной углеродной цепью, остатки которой содержатся в природных жирах и маслах.

Жировая ткань. Специализированная соединительная ткань, которая выполняет функцию запасания больших количеств триацилглицеролов.

Закон действующих масс. Закон, согласно которому скорость любой химической реакции пропорциональна произведению активностей (или концентраций) реагирующих веществ.

Заменимые аминокислоты. Аминокислоты белков, которые могут синтезироваться человеком и другими позвоночными из более простых предшественников и потому их присутствие в пище не обязательно.

Зимоген. Неактивный предшественник фермента; например, пепсиноген.

Изменение стандартной свободной энергии (ΔG^0). Увеличение или уменьшение свободной энергии (в калориях), происходящее при превращении 1 моля реагирующих веществ в 1 моль продуктов при стандартных значениях температуры, давления, концентрации и pH.

Изозимы (изоферменты). Множественные формы фермента, отличающиеся друг от друга по сродству к субстрату, по максимальной активности или по регуляторным свойствам.

Изомераза. Фермент, катализирующий превращение соединения в его структурный изомер.

Изопрен. Углеводород 2-метил-1,3-бутадиен; повторяющаяся структурная единица биомолекул терпеноидов.

Изотермический процесс. Процесс, протекающий при постоянной температуре.

Изотопы. Стабильные или радиоактивные формы элемента, различающиеся по молекулярной массе, но химически очень близкие к наиболее распространенной в природе форме данного элемента; применяются в качестве меток (индикаторов).

Изоэлектрическая точка. Значение pH, при котором растворенное вещество не имеет суммарного электрического заряда.

Иммунный ответ. Способность позвоночных вырабатывать антитела к антигену, т. е. к чужеродным для их организма макромолекулам.

Иммуноглобулин. Белок, являющийся антителом, вырабатываемым к специфическому антигену.

Ингибирование конечным продуктом. Ингибирование аллостерического фермента, функционирующего в начале метаболической цепи, конечным продуктом этой цепи реакций.

Индуктор. Молекула, способная вызывать синтез данного фермента: обычно это субстрат фермента.

Индукционная подгонка. Изменение в конформации фермента с целью приспособления его к структуре субстрата.

Индуцибельный фермент. Фермент, который не вырабатывается клеткой (т. е. его синтез подавлен) до тех пор, пока его синтез не индуцируется своим субстратом или другим близкородственным соединением.

Инициирующие факторы. Специфические белки, необходимые для инициации синтеза полипептида рибосомами.

Инициирующий кодон. Триплет AUG, кодирующий первую аминокислоту в полипептидной цепи, которой у прокариот является N-формилметионин, а у эукариот — метионин.

Инициирующий комплекс. Комплекс рибосомы с мРНК и инициирующей Met-тРНК^{Met} или fMet-тРНК^{fMet}, готовый для элонгации.

Инсерционная последовательность. Специфическая последовательность оснований на обоих концах перемещающегося фрагмента ДНК.

Интеркалирующий мутаген. Мутаген, который встраивается между двумя соседними нуклеотидами и вызывает мутацию со сдвигом рамки.

Интерферон. Белок, вырабатываемый зараженными вирусом клетками позвоночных и препятствующий заражению этих клеток вирусами другого вида.

Интрон. Вставочная последовательность в гене; она транскрибируется, но вырезается до процесса трансляции.

Информационные молекулы. Макромолекулы, несущие информацию в форме специфической последовательности различных строительных блоков; к ним относятся, в частности, белки и нуклеиновые кислоты.

Ион оксония (гидроксоний). Гидратированный ион водорода (H_3O^+).

Ионизирующее излучение. Вид излучения, например рентгеновские лучи, под действием которого из ряда органических молекул выбиваются электроны, в результате чего повышается реакционная способность этих молекул.

Ионообменная смола. Полимерная смола, которая несет фиксированные заряженные группы и используется в хроматографических колонках для разделения ионогенных соединений.

Калория. Количество тепла, необходимое для того, чтобы поднять температуру 1 г воды с 14,5 до 15,5°С.

Канцероген. Химический агент, вызывающий рак.

Капсид. Белковая оболочка вирусной частицы.

Каротиноиды. Жирорастворимые фотосинтетические пигменты, образуемые из изопреновых элементов.

Катаболизм. Фаза метаболизма, включающая деградацию молекул питательных веществ и сопровождающаяся выделением энергии.

Каталитический центр. Участок молекулы фермента, вовлеченный в каталитический процесс.

Катехоламины. Гормоны типа адреналина, представляющие собой аминопроизводные катехола.

Катионообменная смола. Нерастворимый полимер с фиксированными отрицательными зарядами; используется в хроматографическом разделении катионогенных веществ.

«Качание». Сравнительно слабое комплементарное взаимодействие между основанием на 3'-конце кодона и основанием на 5'-конце антикодона.

Квант. Наименьшая единица световой энергии.

кДНК (комплементарная ДНК). ДНК, синтезируемая обычно с помощью обратной транскриптазы и комплементарная данной мРНК; используется для клонирования ДНК.

Кератины. Нерастворимые защитные или структурные белки, состоящие из параллельных полипептидных цепей в α-спиральной или β-конформации.

Кетогенные аминокислоты. Аминокислоты, углеродный скелет которых может служить предшественником кетоновых тел.

Кетоз (кетоацидоз). Состояние, при котором концентрация кетоновых тел в крови, тканях и моче аномально высока.

Кетоновые тела. Продукты неполного окисления жирных кислот – ацетоацетат, D-β-гидроксибутират и ацетон.

Киназа. Фермент, катализирующий фосфорилирование молекулы-акцептора при помощи АТР.

Кислородная задолженность. Дополнительный кислород (сверх нормального уровня), потребляемый в течение восстановительного периода после напряженной физической работы.

Кислые мукополисахариды. Кислые полисахариды, обнаруженные в слизистых выделениях и в межклеточном пространстве высших животных.

Клоны. Потомки одной-единственной клетки.

Ковалентная связь. Химическая связь, образованная общей электронной парой.

Кодон. Последовательность из трех соседних нуклеотидов в нуклеиновой кислоте, кодирующая определенную аминокислоту или какой-либо сигнал.

Коллигативные свойства. Свойства растворов, которые зависят от количества растворенных частиц в единице объема, например понижение точки замерзания.

Коллинеарность. Линейное соответствие между последовательностью аминокислот в полипептиде и той нуклеотидной последовательностью в ДНК и мРНК, которая кодирует этот полипептид.

Конкурентное ингибирование. Тип ингибирования фермента, которое можно снять, повысив концентрацию субстрата.

Константа диссоциации. Константа равновесия для диссоциации соединения на два компонента, например, диссоциации кислоты на анион и протон.

Константа Михаэлиса (K_M). Концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине ее максимальной скорости.

Константа равновесия. Характерная для каждой химической реакции константа, устанавливающая связь между концентрациями всех реагирующих веществ и продуктов реакции в точке равновесия при определенных температуре и давлении.

Конститутивные ферменты. Ферменты главных метаболических путей, которые всегда присутствуют в нормальных клетках.

Конфигурация. Взаимное расположение в пространстве замещающих групп относительно асимметрического атома углерода.

Конформация. Трехмерная структура макромолекулы.

β-Конформация. Вытянутое зигзагообразное расположение полипептидной цепи.

Конъюгация. Процесс, при котором ДНК переносится от F^+-бактерии к F^- -бактерии.

Координированная индукция. Индукция набора связанных между собой ферментов с помощью одного индуктора.

Координированная репрессия. Репрессия набора связанных между собой ферментов.

Кортикостероиды. Стероидные гормоны, вырабатываемые корой надпочечников.

Кофактор. Низкомолекулярное термостабильное неорганическое или органическое соединение, необходимое для проявления активности фермента.

Кофермент. Кофактор органической природы,

необходимый для действия определенных ферментов; часто в качестве составной части содержит витамин.

Кофермент А. Кофермент, содержащий пантотеновую кислоту, который выполняет роль переносчика ацильной группы в ряде ферментативных реакций.

Коэффициент активности. Число, на которое следует умножить концентрацию растворенного вещества, чтобы получить его истинную термодинамическую активность.

Коэффициент распределения. Коэффициент, который показывает, в каком соотношении данное вещество распределяется между двумя несмешивающимися жидкостями при равновесии.

Коэффициент седиментации. Физическая константа, определяющая скорость осаждения частицы в центрифуге при заданных условиях.

Кривая титрования. Кривая, характеризующая зависимость pH от числа эквивалентов основания, добавляемых при титровании кислоты.

Левовращающий изомер. Изомер оптически активного соединения, который вращает плоскость плоскополяризованного света влево.

Летальная мутация. Мутация гена, приводящая к образованию совершенно дефектного генного продукта, неспособного поддерживать жизнедеятельность организма.

Лиганд. Молекула или ион, которые связываются с белком.

Лизогения. Одно из двух возможных состояний клетки-хозяина после заражения умеренным фагом. Лизогения наблюдается в том случае, если геном фага оказывается подавленным и реплицируется в качестве составной части ДНК хозяина. В какой-то момент может произойти индукция генома фага, в результате чего образующиеся фаговые частицы приводят к лизису клетки-хозяина.

Лизосома. Окруженная мембраной органелла в цитоплазме эукариотических клеток, содержащая большое число гидролитических ферментов.

Липид. Нерастворимое в воде вещество со свойствами жира или масла.

Липкий конец. Свободный одноцепочечный конец двухцепочечной ДНК, комплементарный одноцепочечному концу противоположной полярности этой же или другой молекулы ДНК.

Липоевая кислота. Витамин для некоторых микроорганизмов, который служит промежуточным переносчиком водородных атомов и ацильных групп в дегидрогеназах α-кетокислот.

Липопротеин. Сложный белок, содержащий липид или группу липидов.

Литосфера. Неорганическая (минеральная) часть поверхности Земли.

Макромолекула. Молекула с молекулярной массой от нескольких тысяч до многих миллионов.

Матрица. Макромолекулярный шаблон для синтеза информационной макромолекулы.

Матричная РНК (мРНК). Класс молекул РНК, каждая из которых комплементарна одной цепи клеточной ДНК и служит для переноса генетической информации от хромосомы к рибосомам.

Медиатор нервных импульсов. Низкомолекулярное соединение (обычно содержащее азот), секретируемое окончанием нейрона и связывающееся со следующим нейроном; служит для передачи нервных импульсов.

Межклеточное вещество. Коллоидальный гидратированный полисахаридный комплекс, присутствующий в пространстве между клетками животных тканей.

Мембранный транспорт. Перенос растворенного вещества через мембрану, осуществляемый обычно с помощью особого белка мембраны.

Метаболизм. Полная совокупность катализируемых ферментами превращений органических молекул питательных веществ в живых клетках.

Метаболит. Промежуточный продукт (химический интермедиат) в катализируемых ферментами реакциях метаболизма.

Метаболический оборот. Непрерывное метаболическое замещение компонентов клетки с поддержанием их стационарной концентрации на постоянном уровне.

Металлофермент. Фермент, содержащий в качестве простетической группы ион металла.

Микронити. Очень тонкие нити, обнаруживаемые в цитоплазме клетки.

Микросомы. Окруженные мембраной пузырьки, образованные в результате фрагментации эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток и выявляемые при дифференциальном центрифугировании.

Микротельца. Окруженные мембраной цитоплазматические пузырьки, содержащие ферменты, образующие и разрушающие перекиси.

Микротрабекулярная сеть. Сложная сеть, состоящая из очень тонких цитоплазматических нитей; может быть обнаружена только при помощи высоковольтного электронного микроскопа.

Микротрубочки. Тонкие трубочки, собранные из двух типов субъединиц глобулярных белков; присутствуют в ресничках, жгутиках и других сократительных и двигательных структурах.

Микроэлементы. Химические элементы, необходимые организму лишь в следовых количествах.

Миозин. Мышечный белок, основной компонент толстых нитей сократительной системы.

Миофибрилла. Элементарная единица толстых и тонких нитей мышечных волокон.

Митоз. Репликация хромосом в соматических клетках эукариот.

Митохондрии. Окруженные мембраной органеллы, присутствующие в цитоплазме эукариотических клеток; они содержат ферментные системы, необходимые в цикле лимонной кислоты, в транспорте электронов и при окислительном фосфорилировании.

Мицелла. Ассоциация амфипатических молекул в воде, образующих структуру, в которой их неполярные части находятся внутри, а полярные части обращены наружу к молекулам воды.

«Молчащая» мутация. Мутация в гене, не приводящая к видимым изменениям в биологических свойствах генного продукта.

Моль. Молекулярная масса соединения, выраженная в граммах.

Моляльный (m) раствор. Раствор, в котором 1 моль вещества растворен в 1000 г воды.

Молярный (М) раствор. Раствор, в котором 1 моль вещества растворен в 1000 мл раствора.

Моносахариды. Углеводы, содержащие один остаток сахара.

Монослой. Одинарный слой ориентированных липидных молекул.

Мукопротеины. Сложные белки, содержащие кислый мукополисахарид; их называют также протеогликанами.

Мультиферментная система. Последовательность связанных между собой ферментов, участвующих в данном метаболическом пути.

Мутаген. Химический агент, способный вызывать изменения в гене, т. е. мутацию.

Мутаза. Фермент, катализирующий перемещение функциональной группы внутри субстрата.

Мутаротация. Изменение в оптическом вращении раствора сахара или гликозида, находящегося в пиранозной или фуранозной форме, которое связано с достижением равновесия между его α- и β-изомерами.

Мутация. Наследуемое изменение в хромосоме.

Мутация замещения. Мутация, обусловленная заменой одного основания на другое.

Насыщенная жирная кислота. Жирная кислота, содержащая полностью насыщенную алкильную цепь.

Нативная конформация. Биологически активная конформация белковой молекулы.

Негемовые железосодержащие белки. Белки, содержащие железо и не содержащие порфириновую группу.

Незаменимые аминокислоты. Аминокислоты, которые не могут синтезироваться человеком и другими позвоночными и должны поступать с пищей.

Незаменимые жирные кислоты. Группа полиненасыщенных жирных кислот растительного происхождения, которые обязательно должны содержаться в пище млекопитающих.

Нейтральные жиры. Тривиальное название сложных эфиров жирных кислот, образующихся в результате этерифицирования всех трех гидроксильных групп глицерола; обычно их называют триацилглицеролами.

Неконкурентное ингибирование. Тип ингибирования ферментов, которое не снимается при повышении концентрации субстрата.

Ненасыщенная жирная кислота. Жирная кислота, содержащая одну или несколько двойных связей.

Необратимый процесс. Процесс, при протекании которого энтропия Вселенной возрастает.

Неполярная группа. Гидрофобная группа, обычно углеводородная.

Нециклический перенос электронов. Индуцированный светом перенос электронов от воды к $NADP^+$ в ходе фотосинтеза, протекающего с выделением кислорода; в этом процессе участвуют обе фотосистемы I и II.

Низкоэнергетическое фосфатное соединение. Фосфорилированное соединение со сравнительно низкой стандартной свободной энергией гидролиза.

Никотинамидные нуклеотиды (NAD, NADP). Содержащие никотинамид коферменты, выполняющие роль переносчиков атомов водорода и электронов в некоторых окислительно-восстановительных реакциях.

Нингидриновая реакция. Цветная реакция на аминокислоты и пептиды, протекающая при их нагревании с нингидрином; эта реакция широко применяется для выявления аминокислот и пептидов и количественной оценки их содержания.

Нитрогеназная система. Система ферментов,

способных восстанавливать атмосферный азот до аммиака в присутствии АТР.

Нонсенс-кодон. Кодон, который не кодирует ни одну из аминокислот, а указывает место окончания синтеза полипептидной цепи.

Нонсенс-мутация. Мутация, которая приводит к преждевременному окончанию синтеза полипептидной цепи.

Нуклеаза. Фермент, способный гидролизовать межнуклеотидные связи в нуклеиновой кислоте.

Нуклеиновые кислоты. Природные полинуклеотиды, в которых нуклеотидные остатки соединены между собой в определенной последовательности фосфодиэфирными связями.

Нуклеозид. Соединение, состоящее из пуринового или пиримидинового основания, ковалентно связанного с пентозой.

Нуклеозиддифосфатсахар. Переносчик молекулы сахара, выполняющий роль кофермента в ферментативных реакциях синтеза полисахаридов и производных сахаров.

Нуклеозиддифосфат – киназа. Фермент, катализирующий перенос концевого фосфата с нуклеозид-5′-трифосфата на нуклеозид-5′-дифосфат.

Нуклеоид. Ядерная зона в прокариотической клетке; она содержит хромосому, но не окружена мембраной.

Нуклеотид. Нуклеозид, фосфорилированный по одной из гидроксильных групп пентозы.

Нуклеофильная группа. Богатая электронами группа с сильно выраженной способностью отдавать электроны группам, испытывающим недостаток в электронах.

Обратимый процесс. Процесс, протекающий без изменения энтропии.

Обратная мутация. Мутация, приводящая к появлению в мутантном гене нуклеотидной последовательности дикого типа.

Обратная транскриптаза. Синтезируемая ретровирусами РНК-зависимая ДНК-полимераза, способная катализировать синтез ДНК, комплементарной РНК.

Общий интермедиат. Общее для двух химических реакций химическое соединение, являющееся продуктом одной из них и субстратом для другой.

Одноосновная кислота. Кислота, способная диссоциировать с образованием лишь одного протона.

Окисление. Потеря соединением электронов.

β-Окисление. Окислительное расщепление жирных кислот с образованием ацетил-СоА за счет последовательных актов окисления β-углеродного атома.

Окислительно-восстановительная реакция. Реакция, в которой электроны переносятся от донорной молекулы к акцепторной.

Окислительное фосфорилирование. Ферментативное превращение ADP в АТР, сопряженное с переносом электронов от субстрата к молекулярному кислороду.

Окисляющий агент (окислитель). Акцептор электронов в окислительно-восстановительной реакции.

Оксигеназа. Фермент, катализирующий реакцию, в ходе которой в акцепторную молекулу вводится кислород.

Оксигеназы со смешанной функцией. Ферменты, катализирующие одновременное окисление двух субстратов, одним из которых обычно служит NADPH или NADH.

Олигомерный белок. Белок, состоящий из двух или нескольких полипептидных цепей.

Олигосахарид. Несколько моносахаридных групп, соединенных между собой гликозидными связями.

Омыление. Щелочной гидролиз триацилглицеролов с образованием жирных кислот в виде мыл.

Оператор. Область ДНК, которая взаимодействует с белком-репрессором, благодаря чему регулируется экспрессия гена или группы генов.

Оперон. Единица генетической экспрессии, состоящая из одного или нескольких связанных между собой генов, а также из промотора и оператора, которые регулируют их транскрипцию.

Оптимум pH. Значение pH, при котором фермент проявляет максимальную каталитическую активность.

Оптическая активность. Способность вещества вращать плоскость плоскополяризованного света.

Органеллы. Окруженные мембраной структуры, обнаруживаемые в эукариотических клетках; они содержат ферменты и другие компоненты, необходимые для выполнения специальных клеточных функций.

Ортофосфатное расщепление. Ферментативное расщепление АТР до ADP и фосфата, сопряженное обычно с химической реакцией или процессом, требующим затрат энергии.

Осмос. Перемещение воды через полупроницаемую мембрану из одной водной фазы в другую с более высокой концентрацией растворенного вещества.

Осмотическое давление. Давление, возникающее в результате осмотического тока воды через мембрану из одной водной фазы в другую с более высокой концентрацией растворенного вещества.

Основное состояние. Нормальное, стабильное состояние атома или молекулы, которое

в отличие от возбужденного состояния характеризуется минимальной энергией.

Открытая система. Система, которая обменивается материей и энергией с окружающей средой.

Палиндром. Участок ДНК, нуклеотидные последовательности двух цепей которого обладают осевой симметрией второго порядка относительно центра.

Пара оснований. Основания двух нуклеотидов, расположенные в разных цепях нуклеиновой кислоты и взаимодействующие друг с другом за счет водородных связей, например А—Т, А—U или G -С.

Патогенный. Вызывающий болезнь.

Пентоза. Простой сахар, остов которого содержит пять атомов углерода.

Пентозофосфатный путь. Путь окисления глюкозо-6-фосфата с образованием пентозофосфатов.

Пептид. Две или большее число аминокислот, ковалентно соединенных друг с другом пептидными связями.

Пептидаза. Фермент, катализирующий гидролиз пептидной связи.

Пептидная связь. Замещенная амидная связь между α-аминогруппой одной аминокислоты и α-карбоксильной группой другой.

Пептидная карта (фингерпринт). Характерное для данного белка двумерное расположение пептидов, образующихся при его частичном гидролизе.

Первичная половая клетка. Тип животной клетки, образующейся в раннем эмбриогенезе, которая способна делиться путем митоза и мейоза; в процессе мейоза она образует клетки, из которых затем развиваются яйцеклетки или сперматозоиды.

Первичная структура белков. Структура ковалентного остова белка, включающая аминокислотную последовательность, а также дисульфидные мостики внутри цепи и между цепями.

Первый закон термодинамики. Закон, согласно которому при протекании всех процессов общая энергия Вселенной остается постоянной.

Перемещающийся элемент (транспозон). Фрагмент ДНК, который может менять свое положение в геноме.

Переносчик электронов. Белок типа флавопротеина или цитохрома, который может обратимо приобретать и терять электроны и выполнять роль переносчика электронов от органических субстратов к кислороду.

Пероксисомы. См. Микротельца.

Пили. Бактериальные выросты, при помощи которых осуществляется перенос генов из одной клетки в другую в процессе конъюгации.

Пираноза. Простой сахар, содержащий шестичленное кольцо пирана.

Пиридиндегидрогеназы. Дегидрогеназы, коферментом которых служит один из пиридиновых коферментов – NAD или NADP.

Пиридоксальфосфат. Кофермент, содержащий витамин пиродоксин и участвующий в реакциях переноса аминогрупп.

Пиримидин. Азотсодержащее гетероциклическое основание, представляющее собой составную часть нуклеотида или нуклеиновой кислоты.

Пирофосфатаза. Фермент, гидролизующий неорганический пирофосфат с образованием двух молекул (орто) фосфата.

Пирофосфатное расщепление. Ферментативное расщепление АТР до АМР и пирофосфата, энергетически сопряженное с образованием ковалентной связи между двумя биомолекулами.

Пирофосфорилазы. Ферменты, катализирующие образование нуклеозиддифосфатсахаров и пирофосфата из нуклеозид-5′-трифосфата и сахарофосфата.

Пищеварение. Ферментативный гидролиз основных питательных веществ в желудочно-кишечном тракте с утилизацией получающихся при этом строительных блоков.

Плазматическая мембрана. Мембрана, непосредственно окружающая цитоплазму клетки.

Плазмида. Внехромосомная независимо реплицирующаяся небольшая кольцевая молекула ДНК.

Пластида. Самореплицирующаяся органелла в растениях; в результате дифференцировки она может превратиться в хлоропласт.

Полинуклеотид. Последовательность ковалентно связанных нуклеотидов, в которой 3′-положение пентозы одного нуклеотида соединено посредством фосфодиэфирного мостика с 5′-положением пентозы следующего нуклеотида.

Полипептид. Длинная цепь аминокислот, соединенных пептидными связями.

Полирибосома (полисома). Комплекс молекулы мРНК с двумя или большим числом рибосом.

Полисахариды. Линейные или разветвленные макромолекулы, состоящие из множества моносахаридных единиц, соединенных друг с другом гликозидными связями.

Поляриметр. Прибор для определения угла вращения плоскополяризованного света раствором.

Полярная группа. Гидрофильная, т. е. «водолюбивая», группа.

Полярность. В биохимической генетике различие между 5′- и 3′-концами нуклеиновых кислот.

Порфирины. Сложные азотсодержащие соединения, состоящие из четырех замещенных пиррольных циклов, ковалентно соединенных в кольцо; часто в центре порфирина находится атом металла.

Посттрансляционная модификация. Ферментативное преобразование полипептидной цепи после ее синтеза на матрице мРНК.

Правовращающий изомер. Стереоизомер, который вращает плоскость плоскополяризованного света вправо.

Прокариоты. Простые одноклеточные организмы (например, бактерии), содержащие одну хромосому и не имеющие ядерной мембраны и связанных с мембраной органелл.

Промежуточный метаболизм. Ферментативные реакции клеток, в ходе которых химическая энергия извлекается из молекул питательных веществ и используется для синтеза и сборки компонентов клетки.

Промотор. Участок ДНК, с которым может связываться РНК-полимераза, инициируя тем самым транскрипцию.

Простагландины. Класс жирорастворимых гормоноподобных регуляторных молекул, являющихся производными арахидоновой кислоты и других полиненасыщенных жирных кислот.

Простетическая группа. Термостабильная органическая группа (но не аминокислота) или ион металла, которые связаны с белком и выполняют роль его активной группы.

Простой белок. Белок, при гидролизе которого образуются только аминокислоты.

Протеинкиназы. Ферменты, катализирующие фосфорилирование определенных аминокислотных остатков в ряде белков.

Протеогликан. Гибридная макромолекула, состоящая из олиго- или полисахарида, присоединенного к полипептиду, причем полисахарид представляет собой основной компонент молекулы.

Протеолитический фермент. Фермент, катализирующий гидролиз белков или пептидов.

Протоплазма. Общее название всего содержимого живой клетки.

Прохиральная молекула. Симметричная молекула, которая может асимметричным образом реагировать с ферментом, обладающим асимметричным активным центром.

Пурин. Основное азотсодержащее гетероциклическое соединение, присутствующее в нуклеотидах и нуклеиновых кислотах; оно состоит из конденсированных друг с другом пиримидинового и имидазольного колец.

Пуромицин. Антибиотик, который ингибирует полипептидный синтез, встраиваясь в полипептидную цепь и вызывая преждевременную терминацию синтеза.

Равновесие. Состояние системы, соответствующее минимуму свободной энергии, в котором больше уже не происходит никаких изменений.

Радиоактивный изотоп. Изотоп, нестабильное ядро которого переходит в стабильное состояние в результате ионизирующей радиации.

Радиоиммунологический тест. Высокочувствительное количественное определение следовых количеств гормона (или некоторых других биомолекул) по его способности вытеснять радиоактивную форму гормона из комплекса со специфическим антителом.

Разобщающий агент. Вещество, которое разобщает процессы фосфорилирования ADP и транспорта электронов, например 2,4-динитрофенол.

Рацемат. Эквимолярная смесь D- и L-стереоизомеров оптически активного соединения.

Реакция Хилла. Выделение кислорода и фотовосстановление искусственного акцептора электронов препаратами хлоропластов в отсутствие углекислого газа.

Регуляторная последовательность. Нуклеотидная последовательность ДНК, регулирующая экспрессию гена, например промотор или оператор.

Регуляторный ген. Ген, продукт которого принимает участие в регуляции экспрессии другого гена, например ген, кодирующий белок-репрессор.

Регуляторный фермент. Фермент, обладающий регуляторной функцией благодаря его способности изменять свою каталитическую активность в результате нековалентного или ковалентного присоединения особого модулирующего метаболита.

Рекомбинантная ДНК. ДНК, образованная в результате соединения генов в новой комбинации.

Рекомбинация. Соединение генов, группы генов или частей генов в результате биологического процесса или в ходе лабораторного манипулирования, приводящее к новым комбинациям генов.

Ренатурация. Сворачивание расплетенного (т. е. денатурированного) глобулярного белка.

Рентгеноструктурный анализ. Использование метода дифракции рентгеновских лучей на кристаллах исследуемого соединения для определения его трехмерной структуры.

Репликация. Синтез дочерней молекулы двухцепочечной ДНК, идентичной родительской двухцепочечной ДНК.

Репрессибельный фермент. Фермент, синтез которого ингибируется в том случае, если продукт катализируемой им реакции легко доступен бактериальной клетке.

Репрессия фермента. Ингибирование синтеза фермента, обусловленное доступностью продукта этого фермента.

Репрессор. Белок, который связывается с регуляторной последовательностью (оператором) гена и блокирует его транскрипцию.

Рестриктирующие эндонуклеазы. Эндодезоксирибонуклеазы, узнающие специфическую нуклеотидную последовательность и вызывающие расщепление обеих цепей ДНК в сайтах, которые определяются нуклеотидными последовательностями, обладающими симметрией второго порядка относительно центра. Эти ферменты являются важным инструментом генетической инженерии.

Ретровирус. РНК-содержащий вирус, в состав которого входит обратная транскриптаза, т.е. РНК-зависимая ДНК-полимераза.

Рецептор гормона. Специфический участок на поверхности клетки или внутри нее, связывающий гормон.

Рибонуклеаза. Нуклеаза, катализирующая гидролитическое расщепление определенных межнуклеотидных связей в РНК.

Рибонуклеотид. Нуклеотид, содержащий в качестве пентозного компонента D-рибозу.

Рибосома. Макромолекулярный комплекс диаметром ~ 20 нм, состоящий из рРНК и белков и являющийся местом белкового синтеза.

Рибосомная РНК (рРНК). Класс молекул РНК, входящих в состав рибосом.

Рилизинг-факторы (факторы терминации). Входящие в состав цитозоля факторы белковой природы, необходимые для высвобождения готовой полипептидной цепи из рибосомы.

РНК (рибонуклеиновая кислота). Полирибонуклеотид с определенной нуклеотидной последовательностью, в котором рибонуклеотидные остатки соединены между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями.

РНК-полимераза. Фермент, катализирующий синтез РНК из рибонуклеозид-5'-трифосфатов с использованием в качестве матрицы цепи ДНК или РНК.

Саркомер. Функциональная и структурная единица мышечной сократительной системы.

Сателлитная ДНК. Высокоповторяющиеся нетранслируемые участки ДНК в эукариотических клетках.

Сбраживание. Анаэробное расщепление молекул питательного вещества, например глюкозы, сопровождающееся выделением энергии.

Сведберг (S). Единица скорости седиментации частицы в центрифуге.

Световые реакции. Реакции фотосинтеза, которым необходим свет и которые не могут протекать в темноте.

Свободная энергия. Составная часть общей энергии системы, за счет которой система может выполнять работу при постоянных температуре и давлении.

Сдвиг рамки. Мутация, которая обусловлена вставкой или потерей одной или нескольких пар нуклеотидов; приводит к смещению рамки считывания кодонов при биосинтезе белка, в результате чего образующийся белок, начиная с кодона, подвергшегося изменению, имеет искаженную аминокислотную последовательность.

Серповидно-клеточная анемия. Заболевание человека, связанное с нарушением первичной структуру гемоглобина, которое характерно для гомозигот по аллелю, кодирующему β-цепь гемоглобина.

Серповидно-клеточный признак. Состояние человека при пониженном давлении кислорода, свидетельствующее о серповидно-клеточном изменении его эритроцитов; характерен для гетерозигот по аллелю, ответственному за серповидно-клеточную анемию.

Сигнальная последовательность. 5'-лидерная аминокислотная последовательность полипептида, сигнализирующая о месте назначения новосинтезированного белка; с ее помощью белок проходит сквозь определенную мембрану.

Система. Изолированная совокупность материи. Вся прочая материя во Вселенной, находящаяся вне данной системы, называется окружающей средой.

Складчатая структура. Организация связанных водородными связями расположенных рядом («бок о бок») полипептидных цепей в вытянутой β-конформации.

Сложный белок. Белок, содержащий в качестве простетической группы металл или органическое соединение, или и то, и другое.

Соматические клетки. Все клетки организма, за исключением половых клеток и тех клеток, из которых они развиваются.

Сопряженная кислотно-основная пара. Донор протона и его депротонированное производное; например, пара уксусная кислота–ацетат.

Сопряженные реакции. Две химические реакции, имеющие общий интермедиат и обменивающиеся между собой энергией.

α-Спираль. Скрученная, спиральная конформация полипептидной цепи, характеризующаяся максимальным числом внутримолекулярных водородных связей; впервые была найдена в α-кератинах.

Сплайсинг генов. Ферментативное присоединение одного гена или части гена к другому, а также процесс удаления интронов и соединение экзонов при синтезе мРНК.

Спонтанный процесс. Процесс, сопровождающийся увеличением энтропии во Вселенной.

Стандартное состояние. Наиболее стабильное состояние чистого вещества при 1 атм и 25°С (298 К). Для реакций, протекающих в растворе, стандартное состояние растворенного вещества – это 1 М раствор.

Стандартный восстановительный потенциал (E'_0). Электродвижущая сила, возникающая на электроде в присутствии 1 М концентрации восстановителя и его окисленной формы при 25°С и pH 7,0; является мерой относительной способности восстановителя отдавать электроны.

Стереоизомеры. Изомеры молекул, зеркальные изображения которых несовместимы друг с другом.

Стероиды. Класс липидов, содержащих циклопентанфенантреновую кольцевую структуру.

Структурный ген. Ген, кодирующий белки и РНК.

Субстрат. Определенное соединение, на которое действует фермент.

Супрессорная мутация. Мутация, которая полностью или частично восстанавливает функцию, утраченную в результате предшествующей мутации; эта мутация происходит в участке гена, не совпадающем с участком, в котором была локализована предшествующая мутация.

Темновые реакции. Не требующие света ферментативные реакции, протекающие в фотосинтезирующих клетках, которые имеют отношение к синтезу глюкозы из CO_2, АТР и NADPH.

Теплота испарения. Число калорий, затрачиваемое на превращение 1 г жидкости в пар при постоянной температуре.

Терминальная трансфераза. Фермент, способный добавлять нуклеотидные остатки какого-то одного вида к 3′-концу цепей ДНК.

Терминирующая последовательность. Последовательность ДНК, которая находится на конце транскрипционной единицы и служит сигналом окончания транскрипции.

Терминирующие кодоны. Три кодона UAA, UAG и UGA, которые служат сигналами окончания синтеза полипептидной цепи.

Терпен. Углеводород или производное углеводорода, составленное из повторяющихся остатков изопрена.

Тест Эймса. Простой бактериальный тест на канцерогены, основанный на предположении, что канцерогены являются мутагенами.

Тетрагидрофолиевая кислота. Кофермент, представляющий собой восстановленную активную форму витамина фолиевой кислоты.

Тиминовый димер. Димер, состоящий из ковалентно соединенных друг с другом тиминовых остатков в цепи ДНК; появление таких димеров вызывается поглощением ультрафиолетовых лучей.

Тиоэфир. Эфир, образованный карбоксильной группой и тиоловой группировкой или меркаптаном.

Токоферолы. Группа соединений, представляющих собой формы витамина Е.

Токсины. Белки, которые вырабатываются некоторыми организмами и являются ядовитыми для других видов.

Топоизомеразы. Ферменты, способные осуществлять положительное или отрицательное сверхскручивание колец двухцепочечной ДНК.

Трансаминазы. Ферменты, катализирующие перенос аминогрупп от α-аминокислот к α-кетокислотам; их также называют аминотрансферазами.

Трансаминирование. Ферментативный перенос аминогруппы от α-аминокислоты к α-кетокислоте.

Трансдукция. Перенос генетического материала из одной клетки в другую с помощью вирусного вектора.

Транскрипционный контроль. Регуляция белкового синтеза при помощи регуляции образования мРНК.

Транскрипция. Ферментативный процесс, при котором генетическая информация, содержащаяся в одной цепи ДНК, используется для синтеза комплементарной нуклеотидной последовательности в цепи мРНК.

Транслоказа. Фермент, вызывающий какое-либо движение, например перемещение рибосомы вдоль мРНК.

Трансляционный контроль. Регуляция синтеза белка за счет изменения скорости его трансляции в рибосоме.

Трансляция. Процесс, при котором генетическая информация, содержащаяся в молекуле мРНК, направляет синтез соответствующей

аминокислотной последовательности в белке.

Транспирация. Перемещение воды от корней растения в атмосферу через сосудистую систему и листья.

Транспозиция. Перемещение гена или группы генов из одного места генома в другое.

Транспортная РНК (тРНК). Класс молекул РНК (мол. масса 25 000–30 000), каждая из которых на первом этапе белкового синтеза ковалентно соединяется со специфической аминокислотой.

Транспорт электронов. Перемещение электронов от субстрата к кислороду, осуществляемое в дыхательной цепи.

Трансформация. Появление нового фенотипа в результате введения в клетку экзогенной ДНК.

Третичная структура белка. Пространственное расположение полипептидной цепи глобулярного белка, находящегося в нативной свернутой форме.

Триацилглицерол. Эфир глицерола с тремя молекулами жирной кислоты; его называют также нейтральным жиром.

Тропный гормон (тропин). Пептидный гормон, действующий на железу-мишень и стимулирующий секрецию свойственного этой железе гормона; например, тиреотропин гипофиза вызывает секрецию в щитовидной железе тироксина.

Углевод. Альдегид или кетон, содержащий большое число гидроксильных групп.

Удельная активность фермента. Количество микромолей субстрата, преобразуемое препаратом фермента в 1 мин в расчете на 1 мг белка при 25°С.

Удельная теплота. Количество тепла (в калориях), требуемое для того, чтобы поднять температуру 1 г вещества на 1°С.

Удельное вращение. Вращение (в градусах) плоскости плоскополяризованного света (D-линия натрия) оптически активным соединением при 25°С при его определенной концентрации и определенной длине оптического пути.

Ультрафиолетовое излучение. Электромагнитное излучение в диапазоне длин волн 200–400 нм.

Умеренный фаг. Фаг, ДНК которого может встраиваться в геном клетки-хозяина, но не экспрессироваться в отличие от вирулентного фага, который разрушает клетку-хозяина.

Уравнение Гендерсона–Хассельбалха. Уравнение, связывающее pH, pK′ и отношение акцепторов (A^-) и доноров протонов (HA).

Уравнение Лайнуивера–Берка. Уравнение, полученное путем алгебраического преобразования уравнения Михаэлиса–Ментен, позволяющее более точно определить величины V_{max} и K_M.

Уравнение Михаэлиса–Ментен. Уравнение, связывающее скорость ферментативной реакции с концентрацией субстрата.

Устойчивое состояние. Неравновесное состояние динамической системы, при котором происходит перемещение материи, но концентрации всех компонентов остаются неизменными.

УФ-эндонуклеаза. Эндонуклеаза, способная расщеплять цепь ДНК с 5′-стороны от тиминового димера.

Факторы инициации. Специфические белки, необходимые для инициации синтеза полипептида в рибосомах.

Факторы терминации. См. Рилизинг-факторы.

Факторы элонгации. Особые белки, необходимые для элонгации синтеза полипептидных цепей в рибосомах.

Факультативные клетки. Клетки, которые могут жить как в присутствии, так и в отсутствие кислорода.

Фенотип. Наблюдаемые свойства организма.

Ферменты. Белки, катализирующие различные метаболические реакции.

Фибриллярные белки. Нерастворимые белки, которые выполняют защитную или структурную роль; полипептидная цепь в таких белках вытянута или скручена в одном направлении.

Флавинадениндинуклеотид (FAD). Кофермент ряда окислительно-восстановительных ферментов, содержащий рибофлавин.

Флавиндегидрогеназы. Дегидрогеназы, содержащие в качестве кофермента FMN или FAD.

Флавинмононуклеотид (FMN). Рибофлавинфосфат, кофермент ряда окислительно-восстановительных ферментов.

Флавиновые нуклеотиды. Нуклеотидные коферменты (FAD и FMN), содержащие рибофлавин.

Флавопротеин. Белок, содержащий в качестве простетической группы флавиновый нуклеотид.

Флуоресценция. Испускание света молекулами, находящимися в возбужденном состоянии при возвращении их в основное состояние.

Фоновая скорость метаболизма. Скорость потребления кислорода организмом в состоянии полного отдыха по прошествии длительного времени после приема пищи.

Фосфаген. Соединение, запасающее энергию в тканях, способных возбуждаться, содер-

жит высокоэнергетическую фосфатную группу, обычно находящуюся в регулируемом ферментами равновесии с концевой фосфатной группой ATP.

Фосфоглюконатный путь. Окислительный путь, начинающийся с глюкозо-6-фосфата и ведущий через образование 6-фосфоглюконата к NADPH, пентозам и другим продуктам.

Фосфодиэфир. Молекула, содержащая два спиртовых остатка, соединенных эфирной связью с одной молекулой фосфорной кислоты, которая служит, таким образом, мостиком между ними.

Фосфолипид. Липид, содержащий одну или несколько фосфатных групп.

Фосфорилирование. Образование фосфатного производного биомолекулы обычно за счет ферментативного переноса фосфатной группы от ATP.

Фосфорилирование в дыхательной цепи. Окислительное фосфорилирование, т.е. фосфорилирование ADP, сопряженное с переносом электронов от субстрата к кислороду.

Фосфорилирование на уровне субстрата. Фосфорилирование ADP и некоторых других нуклеозид-5′-дифосфатов, сопряженное с дегидрированием органического субстрата и протекающее независимо от переноса электронов.

Фосфорилирующий потенциал (ΔG_p). Изменение свободной энергии при гидролизе ATP в данных условиях.

Фосфоролиз. Ферментативное расщепление соединения в результате взаимодействия с фосфатом, аналогичное гидролизу.

Фотовосстановление. Индуцируемое светом восстановление акцептора электронов в фотосинтезирующих клетках.

Фотодыхание. Потребление кислорода освещенными растениями зоны умеренного климата, происходящее главным образом за счет окисления фосфогликолата.

Фотон. Минимальная единица световой энергии.

Фотосинтез. Использование солнечной энергии для образования углеводов из CO_2 и восстанавливающего агента.

Фотосинтетическое фосфорилирование (фотофосфорилирование). Ферментативное образование ATP из ADP, сопряженное со светозависимым переносом электронов в фотосинтезирующих организмах.

Фотосистема. Система фотосинтезирующих клеток, включающая функциональную группу поглощающих свет пигментов и реакционный центр.

Фураноза. Сахар, содержащий пятичленное фурановое кольцо.

Хемиосмотическое сопряжение. Сопряжение синтеза ATP и переноса электронов через мембрану за счет электрохимического градиента H^+.

Хемотаксис. Способность клеток чувствовать и двигаться по направлению к какому-то химическому агенту или прочь от него.

Хиломикрон. Компонент плазмы крови, представляющий собой крупную каплю триацилглицеролов, стабилизированную с помощью оболочки из белка и фосфолипида.

Химерная ДНК. Рекомбинантная ДНК, содержащая гены из двух разных видов организмов.

Химерный белок. Ковалентно соединенные белки из разных видов организмов; их синтез кодируется химерной ДНК.

Хиральное соединение. Соединение, содержащее асимметрический центр и способное существовать в двух вариантах, зеркальные изображения которых несовместимы.

Хлоропласты. Содержащие хлорофилл фотосинтезирующие органеллы эукариотических клеток.

Хлорофиллы. Зеленые пигменты, выполняющие роль рецепторов световой энергии в фотосинтезе; представляют собой магнийпорфириновые комплексы.

«Холостой цикл». Катализируемая ферментами группа циклических реакций, в ходе которых энергия гидролиза ATP высвобождается в виде тепла.

Хроматин. Нитевидный комплекс ДНК, гистонов и других белков, составляющий основу эукариотических хромосом.

Хроматография. Процесс, при котором сложные смеси молекул могут быть разделены путем многократно повторяющихся актов распределения между стационарной и движущейся фазами.

Хромосома. Одна большая молекула ДНК, содержащая ряд генов и выполняющая функцию хранения и передачи генетической информации.

Центральная догма. Основополагающий принцип биохимической генетики, согласно которому генетическая информация передается от ДНК к РНК и далее к белкам.

Цикл азота. Циклическое превращение биологически доступного азота из одной формы в другую в растениях, животных, микроорганизмах, а также в атмосфере и геосфере.

Цикл лимонной кислоты. Циклическая система ферментативных реакций окисления ацетильных остатков до CO_2, первым этапом которой являетя образованне лимонной кислоты.

Цикл мочевины. Метаболический путь, обнаруживаемый в печени; приводит к синтезу мочевины из аминогрупп и CO_2.

Цикл трикарбоновых кислот. См. Цикл лимонной кислоты.

Циклический AMP (циклический аденилат). Вторичный посредник внутри клеток; его образование при помощи аденилатциклазы стимулируется некоторыми гормонами.

Циклический перенос электронов. Индуцируемый светом перенос электронов в хлоропластах, который начинается и завершается на фотосистеме I.

Цитозоль. Водная фаза цитоплазмы с растворенными в ней веществами.

Цитоплазма. Содержимое клетки, окружающее ядро или нуклеоид.

Цитоскелет. Нитевидные структуры в цитоплазме.

Цитохромы. Гемосодержащие белки, выполняющие роль переносчиков электронов при дыхании и фотосинтезе.

Четвертичная структура. Пространственное расположение подогнанных друг к другу субъединиц олигомерного белка.

Число Авогадро. Число молекул в одном моле любого соединения ($6{,}023 \cdot 10^{23}$).

Число оборотов. Число, указывающее, сколько раз молекула фермента преобразует молекулу субстрата за 1 мин в условиях, когда фермент проявляет максимальную активность.

Экзергоническая реакция. Химическая реакция, сопровождающаяся отрицательным изменением стандартной свободной энергии («нисходящая» реакция).

Экзон. Участок эукариотического гена, транскрипт которого оказывается в зрелой мРНК; он кодирует определенный участок полипептидной цепи белка.

Экзонуклеаза. Фермент, гидролизующий только концевую фосфодиэфирную связь нуклеиновой кислоты.

Электрофорез. Перемещение заряженных растворенных веществ в электрическом поле; часто используется для разделения смесей ионов.

Электрохимический градиент. Сумма градиентов концентрации и электрических зарядов при переносе ионов через мембрану.

Элюат. Жидкость, вытекающая из хроматографической колонки.

Энантиомеры. Изомеры, молекулы которых представляют собой несовместимые друг с другом зеркальные изображения.

Эндергоническая реакция. Химическая реакция, сопровождающаяся положительным изменением стандартной свободной энергии («восходящая» реакция).

Эндокринные железы. Железы, содержащие клетки, специализирующиеся на синтезе гормонов и их секреции в кровь; при помощи гормонов осуществляется регуляция деятельности клеток других типов.

Эндонуклеаза. Фермент, способный гидролизовать внутренние фосфодиэфирные связи в нуклеиновых кислотах.

Эндоплазматический ретикулум. Обширная система двойных мембран в цитоплазме эукариотических клеток; она окружает секреторные каналы и часто усеяна рибосомами.

Энергетический заряд. Степень «заполнения» системы ATP–ADP–AMP высокоэнергетическими фосфатными связями.

Энергетическое сопряжение. Перенос энергии от одного процесса к другому.

Энергия активации. Количество энергии (в килокалориях), необходимое для того, чтобы перевести все молекулы, содержащиеся в 1 моле реагирующего вещества, в состояние переходного комплекса.

Энергия связи. Энергия, необходимая для разрыва связи.

Энергия фосфатной группы. Уменьшение свободной энергии в результате гидролиза 1 моля фосфорилированного соединения до равновесного состояния при концентрации 1,0 М, pH 7,0 и температуре 25°С.

Энтальпия. Содержание тепла в системе.

Энтропия. Мера степени неупорядоченности системы.

Эпимераза. Фермент, способный катализировать обратимые взаимопревращения двух эпимеров.

Эпимеры. Два стереоизомера, различающиеся по конфигурации относительно одного асимметрического центра в соединении, содержащем два или большее число асимметрических центров.

Эукариоты. Организмы, клетки которых содержат окруженное мембраной ядро с множественными хромосомами и внутриклеточные органеллы.

Эффектор (модулятор). Метаболит, который, связываясь с аллостерическим центром регуляторного фермента, меняет его кинетические характеристики.

Ядро. Органелла эукариотической клетки, окруженная мембраной и содержащая хромосомы.

Ядрышко. Интенсивно окрашиваемая структура в ядре эукариотических клеток; участвует в синтезе рРНК и образовании рибосом.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ

Список опечаток

Том	Страница	Напечатано	Следует читать
1	31, подпись к рис. 2-4. Шестая строка сверху	ядреные тельца	ядерные тельца
1	240, Таблица 9-6. I столбик, 3-я строка сверху	1100000	β-Галактозидаза
2	540, Таблица 20-1		1-я, 8-я, 9-я и 20-я строки должны быть красными
2	606, Таблица 20-1		1-я, 2-я, 10-я и 12-я строки должны быть красными

ОГЛАВЛЕНИЕ

Альберт Л. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Том 3

Научный редактор Т. И. Пономарева
Мл. научный редактор З. В. Соллертинская
Художник Г. А. Шипов
Художественный редактор А. Я. Мусин
Технический редактор И. И. Володина
Корректор Т. П. Пашковская

ИБ № 4079

Сдано в набор 17.01.85. Подписано к печати 3.12.85. Формат 70 × 100$^1/_{16}$. Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 10,0 бум. л. Усл. печ. л. 26,0. Усл. кр.-отт. 48,10. Уч. изд. л. 30,35. Изд. № 4/3306. Тираж 25000 экз. Зак. 59. Цена 2 р. 50 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
г. Можайск, ул. Мира, 93.